

**TINGKAT KEKERABATAN INDIVIDUAL GAJAH SUMATERA  
(*Elephas maximus sumatranus*) DI TAMAN SAFARI  
INDONESIA II BERDASARKAN ANALISA GEN  
DISPLACEMENT LOOP DNA MITOKONDRIA  
MELALUI METODE POLYMERASE CHAIN REACTION**

**SKRIPSI**

Oleh:

**REGY MARANDITA**

**135130107111007**



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN  
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2018**

**TINGKAT KEKERABATAN INDIVIDUAL GAJAH SUMATERA  
(*Elephas maximus sumatranus*) DI TAMAN SAFARI  
INDONESIA II BERDASARKAN ANALISA GEN  
DISPLACEMENT LOOP DNA MITOKONDRIA  
MELALUI METODE POLYMERASE CHAIN REACTION**

**SKRIPSI**

*Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Kedokteran Hewan*

Oleh:

**REGY MARANDITA**

**135130107111007**



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN  
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2018**

**LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI**

**TINGKAT KEKERABATAN INDIVIDUAL GAJAH SUMATERA  
(*Elephas maximus sumatranus*) DI TAMAN SAFARI INDONESIA II  
BERDASARKAN ANALISA GEN *DISPLACEMENT LOOP*  
DNA MITOKONDRIA MELALUI METODE  
*POLYMERASE CHAIN REACTION***

**Oleh:**

**REGY MARANDITA**

**135130107111007**

Setelah dipertahankan didepan Majelis Penguji  
pada tanggal 3 Januari 2018  
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

**Dr.Ir.Gatot Ciptadi, DESS**  
NIP. 196005121987011001

**drh.Dyah Ayu Oktavanie, M.Biotech**  
NIP. 19841026 200812 2 004

Mengetahui,  
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan  
Universitas Brawijaya

**Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES**  
NIP. 19600903 198802 2 001

## LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Regy Marandita  
NIM : 135130107111007  
Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan  
Penulis Skripsi berjudul:

**Tingkat Kekerabatan Individual Gajah Sumatera (*Elephas maximus sumatranus*) di Taman Safari Indonesia II Berdasarkan Analisa Gen *Displacement Loop* DNA Mitokondria Melalui Metode *Polymerase Chain Reaction*.**

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar – benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 15 Januari 2018  
Yang menyatakan,

**(Regy Marandita)**  
**NIM. 135130107111007**

## Tingkat Kekerabatan Individual Gajah Sumatera Di Taman Safari Indonesia II Berdasarkan Analisa Gen *Displacement Loop* DNA Mitokondria Melalui Metode *Polymerase Chain Reaction*

### ABSTRAK

Gajah Sumatera merupakan salah satu hewan endemik Indonesia yang populasinya semakin sedikit. Pengkajian keragaman genetik menggunakan DNA mitokondria (mtDNA) membantu dalam membedakan intra dan interspesies sehingga dapat digunakan untuk mendukung konservasi genetik dari gajah Sumatera. Fragmen bukan penyandi protein yang sering digunakan dalam mengkaji hubungan kekerabatan diantara spesies yaitu daerah D-loop (*Displacement loop*). Penelitian ini bertujuan mengetahui tingkat kekerabatan dan jarak genetik berdasarkan sekuen gen D-loop dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) pada Gajah Sumatera (*Elephas maximus sumatranus*) dan dibandingkan dengan *database* NCBI gen d-loop Gajah Afrika (*Loxodonta africana*). DNA didapatkan dari empat sampel *wholeblood* gajah Sumatera, 2 jantan dan 2 betina dari Taman Safari Indonesia II yang diisolasi menggunakan *DeRiPRO™ 3-In-1 Extraction Kit*. Primer yang digunakan dalam metode PCR adalah primer *forward* (D-LOOP\_F) 5'-GCATTACATGCTCGTCCCCATAC-3' dan *reverse* (D-LOOP\_R) 5'-TGGTGGTTTCTCGGAGGTAG-3'. Sekuensing hasil PCR dilakukan dengan metode *Sanger*. Analisa sekuen gen menggunakan program NCBI BLAST dan *Bioedit*. Hasil penelitian menunjukkan gajah Sumatera Subaru memiliki ident sebesar 99% terhadap gen d-loop Gajah Asia (*Elephas maximus*), sedangkan gajah Sumatera Nebi memiliki ident sebesar 98%. Rekonstruksi pohon filogenetik menggunakan software MEGA dengan metode *Neighbor Joining 1000x bootstrap* dan *pairwise distance* menunjukkan gajah Sumatera Subaru dan gajah Sumatera Nebi memiliki jarak genetik 0%. Kedua gajah Sumatera memiliki jarak genetik 1,4% dengan referensi gajah Asia dan 5% terhadap referensi gajah Afrika. Kesimpulan dari penelitian ini ialah gajah Sumatera Subaru dan gajah Sumatera Nebi memiliki tingkat kemiripan genetik sebesar 100% berdasarkan gen D-loop yang menunjukkan keduanya berkerabat sangat dekat secara genetik.

Kata kunci : Gajah Sumatera, mtDNA, D-loop, PCR

**Individuals Genetic Relationship of Sumatran Elephant (*Elephas maximus sumatranus*) in Taman Safari Indonesia II Based on Analysis of Mitochondrial DNA Displacement Loop Using Polymerase Chain Reaction Method**

**ABSTRACT**

Sumatran elephant is one of the endemic animals in Indonesia which having a decreased population. Assessing genetic diversity using mitochondrial DNA (mtDNA) helps in differentiation intraspecies and interspecies hence can be used to support the genetic conservation of Sumatran elephants. A Non-coding fragment of the protein that is often used in assessing genetic relationships among species is D-loop (Displacement loop) area. The aim of this study was to find out the genetic relationship and genetic distance based on the sequence of D-loop genes by Polymerase Chain Reaction (PCR) method on Sumatran Elephant (*Elephas maximus sumatranus*) compared to NCBI database of African Elephant (*Loxodonta africana*) d-loop gene. The DNA was isolated from four whole blood samples of Sumatran elephant in Taman Safari Indonesia II Prigen using DeRiPRO™ 3-In-1 Extraction Kit. The primer used in the PCR method is (D-LOOP\_F) 5'-GCATTACATGCTCGTCCCCATAC-3' and (D-LOOP\_R) 5'-TGGTGGTTTCTCGGAGGTAG-3'. The sequencing of PCR results was done by Sanger method. The analysis of gene sequence was done by using Bioedit and NCBI BLAST. The result of this study shows that sample of Sumatran elephant named Subaru has ident of 99% towards Asian elephant (*Elephas maximus*) d-loop gene, while the sample of Sumatran elephant named Nebi has ident of 98%. The phylogenetic tree which constructed using MEGA software with neighbor-joining method bootstrap 1000x and pairwise distance show that Sumatran elephant Subaru and Nebi have 0% genetic distance. Both samples have a genetic distance of 1,4% with Asian elephant reference and 5% with African elephant reference. The conclusion of this study is Sumatran elephant sample named Subaru and Nebi have a genetic similarity of 100% based on D-loop gene sequence which then shows that both of them are very closely related genetically.

**Keywords:** mtDNA, D-loop, Sumatran Elephant, PCR



## KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT, karena atas berkenaan-Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“Tingkat Kekerabatan Individual Gajah Sumatera (*Elephas maximus sumatranus*) di Taman Safari Indonesia II Berdasarkan Analisa Gen *Displacement Loop* DNA Mitokondria Melalui Metode *Polymerase Chain Reaction*.”** sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan di Universitas Brawijaya.

Atas terselesaikannya proposal skripsi ini, penulis mengucapkan terimakasih kepada:

1. Dr.Ir.Gatot Ciptadi, DESS dan drh. Dyah Ayu Oktavianie, M.Biotech selaku dosen pembimbing atas bimbingan, nasihat, saran dan segala perhatian yang telah diberikan selama penyusunan skripsi ini.
2. Drh. Wawid Purwatiningsih, M.Vet dan drh. Aulia Firmawati, M.Vet selaku dosen penguji yang telah memberikan masukan dan saran selama pelaksanaan ujian skripsi.
3. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.
4. Drh. Nanang Tedjolaksono selaku dokter hewan Taman Safari Indonesia II Prigen atas kesempatan dan kepercayaan yang diberikan kepada penulis.
5. Keluarga penulis, Ayah Sumariyono dan Ibunda Anik Dyah Pratiwi atas segala pengorbanan, doa, materi dan kasih sayang yang tak terhingga kepada penulis.
6. Keluarga besar Improve KELAWAR yang telah memberi masukan, dorongan, semangat, dan pengetahuan tentang satwa liar, teman seperjuangan PANDEKA BALANG yaitu Ristanti Putri Utami, Layliyah Roziqoh, Widy Parameita dan Ratna yang telah memberi masukan, motivasi, dan semangat selama proses penulisan skripsi kepada penulis, Muhammad Abdillah S.kh yang telah meluangkan waktu untuk

memberikan arahan selama menjalankan penelitian dan anggota kelas TIVA yang telah menemani proses belajar selama 4 tahun masa pendidikan dokter hewan.

Akhir kata penulis berharap semoga Allah SWT membalas segala kebaikan yang telah diberikan kepada penulis, dan semoga Skripsi ini dapat memberikan manfaat baik bagi penulis maupun pembaca.

Malang, 7 Juni 2017

Penulis





## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>HALAMAN JUDUL .....</b>	<b>ii</b>
<b>LEMBAR PENGESAHAN .....</b>	<b>iii</b>
<b>LEMBAR PERNYATAAN .....</b>	<b>iv</b>
<b>ABSTRAK .....</b>	<b>v</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>vi</b>
<b>KATA PENGANTAR.....</b>	<b>vii</b>
<b>DAFTAR ISI.....</b>	<b>ix</b>
<b>DAFTAR TABEL .....</b>	<b>xi</b>
<b>DAFTAR GAMBAR.....</b>	<b>xii</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN.....</b>	<b>xiii</b>
<b>DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG .....</b>	<b>xiv</b>
<b>BAB I PENDAHULUAN.....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
1.1 Latar Belakang .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
1.2 Rumusan Masalah .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
1.3 Batasan Masalah.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
1.4 Tujuan Penelitian.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
1.5 Manfaat Penelitian.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.1 Gajah Sumatera .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.2 Morfologi dan Klasifikasi Gajah Sumatera.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.3 DNA mitokondria (mtDNA) .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.4 Gen D-loop .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.5 <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR).....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.5.1 Teknik Dasar Amplifikasi PCR .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.5.5.1 Denaturasi Untai Ganda DNA.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.5.5.2 Primer Annealing .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.5.5.3 DNA Polymerase Extension.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.6 Sekuensing DNA.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN.....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.1 Kerangka Konseptual .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>

3.2	Bagan Kerangka Konseptual .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.3	Hipotesis Penelitian.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN.....</b>		<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.1	Waktu dan Tempat Penelitian .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.2	Alat dan Bahan .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.3	Tahapan Penelitian .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.4	Rancangan Penelitian .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.5	Prosedur Kerja.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.5.1	Pemilihan Gajah Sumatera.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.5.2	Pengambilan Sampel Darah Gajah Sumatera	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.5.3	Isolasi DNA .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.5.4	Uji Kuantitas dan Kualitas DNA .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.5.4.1	Uji Kuantitas DNA.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.5.4.2	Uji Kualitas DNA.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.5.5	Desain Primer.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.5.6	Proses Polymerase Chain Reaction (PCR)	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.5.7	Uji Kuantitas dan Kualitas Produk PCR	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.5.8	Purifikasi Produk PCR.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.5.9	Sekuensing DNA .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.5.10	Analisa Data.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>		<b>Error! Bookmark not defined.</b>
5.1	Isolasi DNA dari Darah Gajah Sumatera	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
5.2	Amplifikasi Gen D-loop dengan Metode PCR	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
5.3	Sekuensing Gen D-loop .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
5.4	Analisa Sekuen DNA Gen D-loop .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
5.5	Hubungan Kekerabatan Gajah Sumatera	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>BAB 6 PENUTUP .....</b>		<b>Error! Bookmark not defined.</b>
6.1	Kesimpulan.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
6.2	Saran.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>		<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>		<b>Error! Bookmark not defined.</b>

## DAFTAR TABEL

### Tabel

### Halaman

Tabel 4.1 Informasi Individu Sampel Gajah Sumatera **Error! Bookmark not defined.**

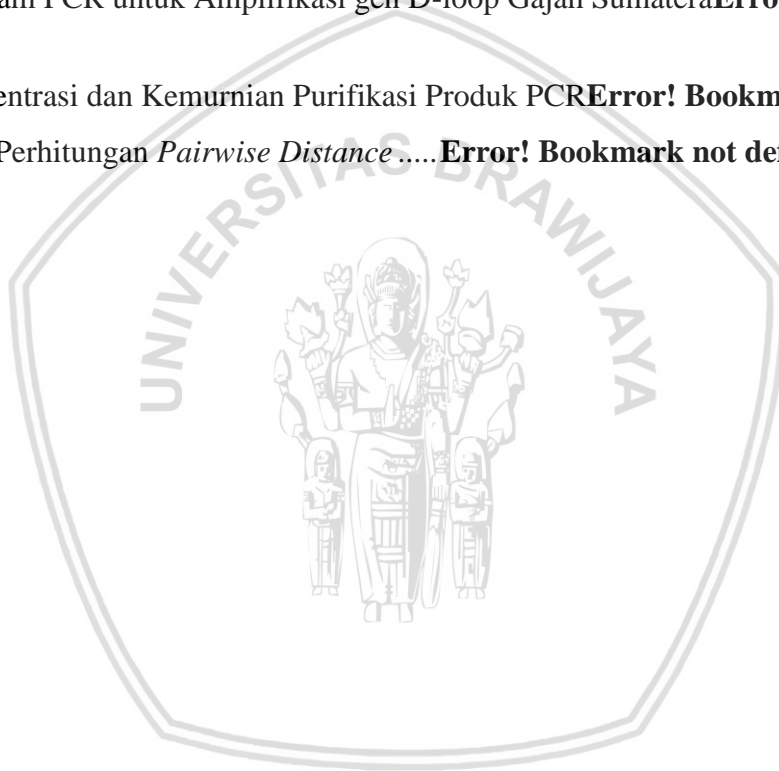
Tabel 5.1 Konsentrasi dan Kemurnian DNA Gajah Sumatera **Error! Bookmark not defined.**

Tabel 5.2 Urutan Oligo Nukleotida Primer gen D-loop Gajah Sumatera **Error! Bookmark not defined.**

Tabel 5.3 Program PCR untuk Amplifikasi gen D-loop Gajah Sumatera **Error! Bookmark not defined.**

Tabel 5.4 Konsentrasi dan Kemurnian Purifikasi Produk PCRE **Error! Bookmark not defined.**

Tabel 5.5 Data Perhitungan *Pairwise Distance* ..... **Error! Bookmark not defined.**



## DAFTAR GAMBAR

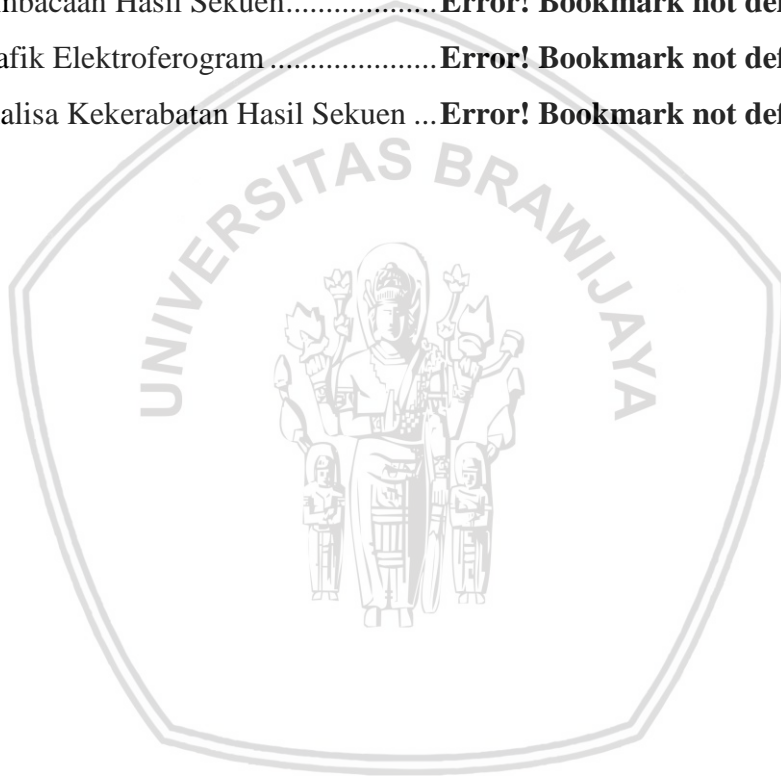
Gambar	Halaman
Gambar 2.1 Induk dan Anak Gajah Sumatera .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Gambar 2.2 DNA Mitokondria .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Gambar 2.3 Skema satu siklus PCR .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Gambar 2.4 Skema sekuensing DNA metode Sanger	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Gambar 3.1 Bagan Kerangka Konseptual.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Gambar 4.1 Kerangka Operasional Penelitian.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Gambar 5.1 Hasil Elektroforesis DNA Total.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Gambar 5.2 <i>Origin</i> Oligo Nukleotida Gen D-loop	
Gambar 5.3 Hasil Elektroforesis Produk PCR.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Gambar 5.4 Hasil Elektroforesis Purifikasi Produk PCRE	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Gambar 5.5 Hasil BLAST gen D-loop nukleotida sampel Subaru	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Gambar 5.6 Hasil BLAST gen D-loop nukleotida sampel Nebi	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Gambar 5.7 Penyajaran sekuen gen D-loop.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Gambar 5.9 Pohon filogenetik .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>

## DAFTAR LAMPIRAN

### Lampiran

### Halaman

Lampiran 1. Protokol Isolasi DNA .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Lampiran 2. Desain Primer .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Lampiran 3. Protokol Purifikasi Produk PCR.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Lampiran 4. Hasil Uji Kuantitatif DNA Total .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Lampiran 5. Hasil Uji Kuantitatif Purifikasi Produk PCRError!	<b>Bookmark not defined.</b>
Lampiran 6. Pembacaan Hasil Sekuen.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Lampiran 7. Grafik Elektroferogram .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Lampiran 8. Analisa Kekerabatan Hasil Sekuen ...	<b>Error! Bookmark not defined.</b>



## DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

### Simbol/singkatan

### Keterangan

%

Persen

°C

Derajat Celcius

μL

Mikroliter

AE

*Eluted buffer*

AIDS

Acquired Immunodeficiency syndrome

AL

*Lysis buffer*

BLAST

*Basic Local Alignment Search Tool*

Bp

*Base Pair*

CDS

*Coding DNA Sequence*

CITES

*Convention on International Trade in Species of Wild Fauna and Flora*

*Endangered*

Cm

Sentimeter

COI

*Cytochrome Oxidase SubUnit I*

ddH<sub>2</sub>O

*Doubele distilled water*

DKI

Daerah Keistimewaan Ibukota

DNA

*Deoxyribonucleic Acid*

dNTP

*Triphospat deoxynucleoside*

ddNTPs

*Dideoksinukleotida triphospat*

EtBr

*Etidium bromida*

g

Gram

HCl

*Hydrochloric acid*

IUCN

*International Union for Conservation of Nature*

kb

*Kilobase*

Kg

Kilogram

Mg

Magnesium

mL

Mililiter

mM

Milimolar

mRNA

messenger-RNA

mtDNA

DNA Mitokondria

NCBI

*National Center for Biotechnology Information*

ng

Nanogram

PCR

*Polymerase Chain Reaction*

pH

potential of Hydrogen

Pmol

*Picomol*

Permentan

Peraturan Menteri Kehutanan

RNA

*Ribonucleic acid*

SB

Sapi Bali

SJ

Sapi Jaliteng

SM

Sebelum Masehi

*Taq*

*Thermus aquaticus*

TBE

*Tris/Borate/EDTA*

UV

Ultraviolet



## BAB I PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Gajah Sumatera merupakan salah satu hewan endemik Indonesia yang juga berperan sebagai payung konservasi bagi makhluk hidup di sekitarnya. Populasi Gajah Sumatera kini memprihatinkan karena habitat yang semakin sempit, perburuan dan perdagangan satwa liar ilegal. Pada tahun 1985 tercatat estimasi populasi Gajah Sumatera yang berada di alam liar berkisar antara 2800–4800 ekor dan tersebar di 44 titik di seluruh wilayah pulau Sumatera. Hasil survey yang dilakukan kembali pada tahun 2007 tercatat populasi Gajah Sumatera yang berada di alam liar hanya berkisar antara 2400-2800 ekor. Hal tersebut disebabkan adanya program translokasi dari alam liar ke tempat penangkaran yang lokasinya jauh sehingga beberapa gajah tidak dapat bertahan dan mati pada proses translokasi tersebut, konflik antara warga dan gajah juga merupakan faktor penurunan populasi gajah di alam liar. Secara garis besar, 50% populasi gajah di alam liar berkurang dalam kurun waktu 23 tahun (Gopala *et.al*, 2011).

Berdasarkan *red list* IUCN (2011), status konservasi Gajah Sumatera adalah kritis (*critically endangered*) dan gajah telah ditetapkan sebagai satwa dilindungi menurut Undang-Undang No 5 Tahun 1990 tentang Konservasi Sumber Daya Alam Hayati dan Ekosistemnya dan diatur dalam peraturan pemerintah PP 7/1999 tentang Pengawetan Jenis Tumbuhan dan Satwa. Sedangkan CITES telah mengkategorikan gajah asia (*Elephas maximus*) dalam kelompok Appendix 1 yaitu daftar tentang perlindungan seluruh spesies tumbuhan dan satwa liar yang terancam dari segala bentuk perdagangan.

Upaya peningkatan populasi Gajah Sumatera telah dilakukan di lembaga konservasi baik ek-situ seperti Taman Safari Indonesia ataupun in-situ seperti Taman Nasional Way-Kambas. Gajah jantan dan betina yang telah dewasa dikawinkan agar menghasilkan anakan gajah dan meningkatkan populasi gajah. Di Taman Safari Indonesia II, koleksi Gajah Sumatera dewasa yang digunakan sebagai indukan sebagian besar dari daerah yang sama yaitu Lampung, namun Gajah Sumatera hasil translokasi dari alam liar tersebut tidak memiliki silsilah keturunan yang jelas sehingga sulit diketahui kekerabatan antara masing-masing individu. Hal tersebut dapat meningkatkan resiko *in-breeding* dan menurunkan kualitas genetik pada anakan yang dihasilkan.

Pengkajian keragaman genetik melalui penandaan molekuler menggunakan DNA (*Deoxyribonucleic Acid*) baik pada DNA inti dan DNA mitokondria (mtDNA) membantu dalam mengetahui perbedaan dengan lebih akurat dalam membedakan intra dan interspesies yang menyangkut tentang struktur, komposisi dan organisasi genom pada tingkat DNA. Di dalam genom mitokondria terdapat fragmen-fragmen penyandi protein dan yang bukan penyandi protein. Fragmen bukan penyandi protein yang sering digunakan dalam mengkaji hubungan kekerabatan di antara spesies adalah daerah D-loop. (Faizah, 2009).

D-loop juga disebut sebagai *control region* karena perannya dalam replikasi dan transkripsi mtDNA. Panjang dari D-loop sekitar 1 kb yang dengan mudah dapat di amplifikasi menggunakan metode PCR untuk kemudian di sekuensing sehingga dapat menentukan diversitas pada tahap molekuler (Arif *and* Khan, 2009). Laju mutasi D-loop sebagai salah satu mtDNA 4-5 kali lebih cepat dibandingkan mtDNA lain, sehingga penggunaan sekuen bagian pengontrol atau

D-loop nukleotida dapat memberikan resolusi yang baik dalam mempelajari jenis yang berkerabat dekat (Horai *et al*, 1993).

Berdasarkan hal-hal yang telah dipaparkan diatas, maka penelitian ini dilakukan untuk mengetahui tingkat kekerabatan individual Gajah Sumatera berdasarkan sekuen gen D-loop dengan metode (PCR) di Taman Safari Indonesia II Prigen. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang hubungan kekerabatan antar Gajah Sumatera asal Lampung di TSI II Prigen sehingga dapat digunakan sebagai referensi dalam melakukan perkawinan antar individu Gajah Sumatera tersebut.

### 1.2 Rumusan Masalah

Bagaimana tingkat kekerabatan individual Gajah Sumatera (*Elephas maximus sumatranus*) yang berada di Taman Safari Indonesia II Prigen berdasarkan sekuen gen D-loop dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) ?

### 1.3 Batasan Masalah

1. Sampel yang digunakan adalah darah Gajah Sumatera (*Elephas maximus Sumateranus*) dewasa (usia >30 tahun), asal Lampung, berjenis kelamin jantan dan betina yang berada di Taman Safari Indonesia II Prigen Jawa Timur.
2. Gen D-Loop diisolasi dari darah Gajah Sumatera menggunakan *DeRiPRO™ 3-In-1 Extraction Kit* (50). Pengambilan sampel darah dilakukan melalui *vena auricularis*.
3. Primer gen D-loop didesain menggunakan gen D-loop dari Gajah Asia (*Elephas maximus*) menggunakan program Primer 3plus

4. Amplifikasi DNA gen *Displacement Loop* (D-loop) Gajah Sumatera dilakukan dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan menggunakan sepasang primer *forward* (D-LOOP\_F) 5'-GCATTACATGCTCGTCCCCATAC-3' dan primer *reverse* (D-LOOP\_R) 5'-TGGTGGTTTCTCGGAGGTAG-3'

5. Metode PCR dilakukan dengan mesin SensoQuest Thermocycler dengan program: predenaturasi 94°C selama empat menit, denaturasi 94°C selama 30 detik, annealing 53,5°C selama 30 detik, extension 72°C selama satu menit, dan post extension 72°C selama tujuh menit.

6. Sekuensing DNA dilakukan dengan metode *dye terminator labelling* dengan menggunakan sepasang primer *forward* (D-LOOP\_F) 5'-GCATTACATGCTCGTCCCCATAC-3' dan primer *reverse* (D-LOOP\_R) 5'-TGGTGGTTTCTCGGAGGTAG-3'.

7. Analisa data dilakukan dengan mendeskripsikan perbedaan sekuen DNA dan tingkat kekerabatan antara Gajah Sumatera yang berada di TSI II Prigen, Gajah Asia dan Gajah Afrika menggunakan program Bioedit dan *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) dari NCBI serta program MEGA.

#### 1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui homologi gen dan tingkat kekerabatan individual berdasarkan sekuen gen D-loop dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) pada Gajah Sumatera (*Elephas maximus sumatranus*) yang berada di Taman Safari Indonesia II.

### 1.5 Manfaat Penelitian

Diharapkan penelitian ini bermanfaat dalam menyediakan informasi genetik berupa perpustakaan gen untuk keperluan konservasi Gajah Sumatera dan dapat digunakan untuk pertimbangan dalam melaksanakan program *breeding* di Taman Safari Indonesia II Prigen.



## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 1.1 Gajah Sumatera

Gajah (ordo *Proboscidea*) merupakan mamalia darat terbesar yang masih ada. Hanya tersisa 3 spesies dari ordo ini, yaitu Gajah Asia (*Elephas maximus*), Gajah sabana Afrika (*Loxodonta africana*) dan Gajah hutan Afrika (*Loxodonta cyclotis*). Gajah Asia memiliki 3 subspecies yang tersebar di Asia, yaitu Gajah India (*Elephas maximus indicus*), Gajah Srilanka (*Elephas maximus maximus*) dan Gajah Sumatera (*Elephas maximus sumatranus*). Persebaran Gajah India lebih luas dari pada Gajah Srilanka dan Gajah Sumatra, Gajah India (*Elephas maximus indicus*) dapat ditemukan di Thailand, Vietnam, China, Cambodia, Myanmar dan Asia Tenggara, sedangkan Gajah Sumatera (*Elephas maximus sumatranus*) hanya dapat ditemukan di pulau Sumatera, Indonesia (Choudury *et al*, 2008).

Gajah Sumatera merupakan hewan endemik Indonesia dengan populasi paling sedikit dibanding jenis gajah lain. Gajah di hutan Sumatera merupakan payung konservasi dimana keberadaannya menjadi jaminan bahwa makhluk hidup di habitat tersebut masih terjaga. Wilayah penyebaran Gajah di pulau Sumatera semakin hari semakin sedikit karena adanya alih fungsi hutan yang menyebabkan penyebaran Gajah Sumatera terfragmentasi. Saat ini wilayah penyebaran Gajah Sumatera di alam liar hanya meliputi Provinsi Aceh, Sumatera Utara, Riau, Jambi, Sumatera Selatan, Bengkulu dan Lampung. Gajah merupakan hewan penjelajah yang cenderung melakukan pergerakan dalam wilayah jelajah yang luas sehingga menggunakan lebih dari satu tipe habitat, diantaranya hutan rawa, hutan rawa

gambut, hutan dataran rendah dan hutan hujan pegunungan rendah (Altevogt *and* Kurt, 1997).

## 1.2 Morfologi dan Klasifikasi Gajah Sumatera

Secara Genus, Gajah Afrika (Genus *Loxodonta*) dan Gajah Asia (genus *Elephas*) memiliki perbedaan bentuk tubuh yang mudah dikenali, sedangkan untuk sesama genus *Elephas*, cenderung memiliki banyak persamaan dengan sedikit perbedaan yang tidak mencolok. Bobot Gajah Sumatera sekitar 3-5 ton dengan tinggi 2-3 meter. Kulitnya lebih terang dibanding gajah Asia lain dan dibagian telinga sering terlihat depigmentasi, terlihat seperti flek putih kemerahan. Hanya gajah jantan yang memiliki gading yang panjang. Pada betina, gading berukuran pendek hampir tidak kelihatan. Berbeda dengan gajah Afrika dimana jantan dan betina sama-sama punya gading. Ciri mencolok lainnya ada pada bagian atas kepala. Gajah sumatera memiliki dua tonjolan sedangkan gajah Afrika cenderung datar. Telinga gajah sumatera lebih kecil dan berbentuk segitiga sedangkan gajah Afrika telinganya lebar dan berbentuk kotak. Gajah Sumatera memiliki 5 kuku di kaki bagian depan dan 4 kuku di kaki belakang (Jurnal bumi, 2016).

Klasifikasi Gajah Sumatera menurut Fowler dan Mikota (2006):

Kerajaan	: Animalia
Filum	: Chordata
Kelas	: Mammalia
Bangsa	: Proboscidea
Suku	: Elephantidae



Marga : *Elephas*  
Jenis : *Elephas maximus*  
Anak Jenis : *Elephas maximus sumatranus*



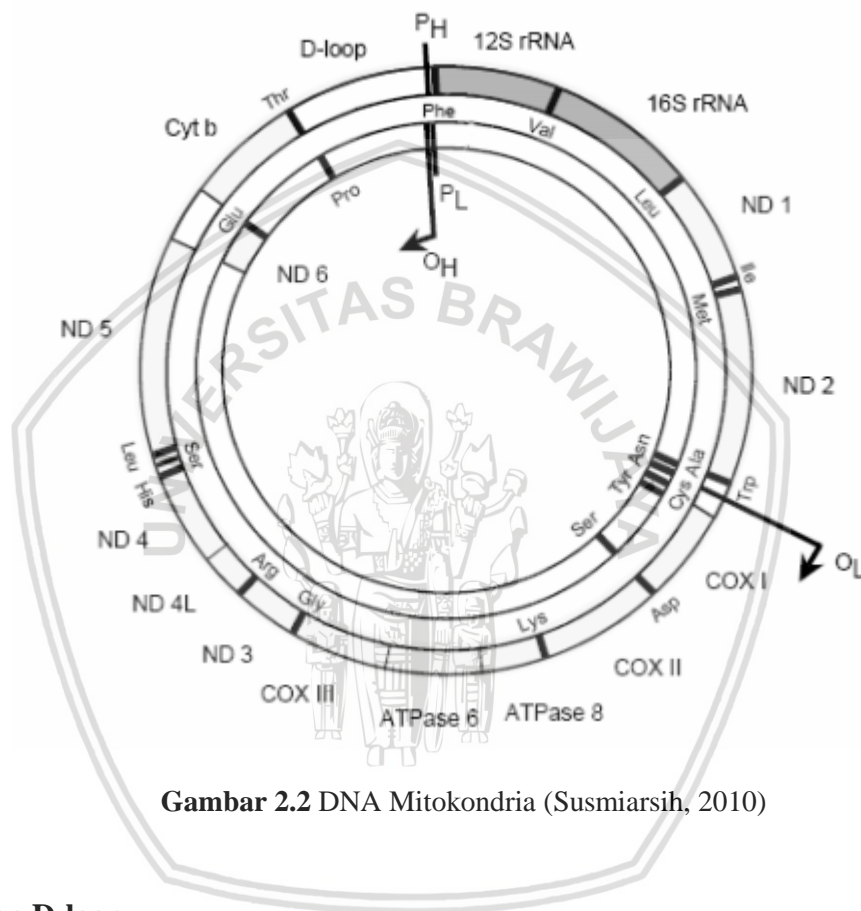
**Gambar 2.1** Induk dan Anak Gajah Sumatera (WWF, 2017)

### 1.3 DNA mitokondria (mtDNA)

DNA mitokondria (mtDNA) merupakan penanda forensik yang cukup penting. MtDNA memiliki sifat genetik khas yang membedakannya dari DNA inti. MtDNA diturunkan secara maternal tanpa rekombinasi dan laju mutasinya lebih tinggi dibandingkan DNA inti. D-Loop merupakan daerah non penyandi yang memiliki polimorfisme tertinggi dalam mtDNA. Analisis variasi urutan nukleotida daerah D-Loop dapat digunakan untuk menentukan identitas manusia serta hubungan kekerabatan antar individu secara maternal (Ratnayani, 2009).

mtDNA dalam organisme uniseluler bervariasi dalam ukuran, bentuk dan susunan gennya. Sedangkan, mtDNA pada organisme lebih tinggi strukturnya sangat uniform. Genom mitokondria tidak memiliki intron atau spacer antar gen dan bahkan ada gen yang saling tumpang tindih. Genom mitokondria tersusun dari dua untai DNA yaitu untai luar yang disebut sebagai *heavy (H) strand* dan untai dalam disebut *light (L) strand*. Karakter yang mencolok dari struktur gen genom mitokondria adalah kepadatan gen yang tinggi dengan pengecualian pada daerah

dimana awal replikasi dari untai berat (*H strand*) mtDNA terjadi (daerah D-loop). Gen yang ditemukan pada mitokondria yaitu 13 gen penyandi protein (3 subunit sitokrom oksidase (CO I-III), 7 subunit NADH-dehidrogenase (ND 1-6 dan ND 4L), 2 subunit ATPase (6 dan 6L) dan sitokrom b (Cyt b)); 2 gen rRNA (12S dan 16S); dan 22 gen tRNA (Wandia, 2001).



Gambar 2.2 DNA Mitokondria (Susmiarsih, 2010)

#### 1.4 Gen D-loop

Terdapat suatu daerah pengontrol pada mtDNA yang tidak menyandi (non coding region), disebut sebagai displacement loop (D-loop). D-loop merupakan daerah kontrol utama ekspresi mtDNA, dan berfungsi sebagai promotor utama transkripsi. Di daerah D-loop terdapat dua daerah yang sangat bervariasi yaitu hypervariable region 1 (HVR1) dan hypervariable region 2 (HVR2), kedua daerah

ini tidak menyandi gen tertentu, namun telah diketahui berperan penting pada studi populasi (Susmiarsih, 2010).

D-loop memiliki adaptasi yang tinggi terhadap mutasi sehingga antar individu yang tidak segaris keturunan ibu D-loopnya dapat sangat berbeda. Adaptasi D-loop terhadap mutasi disebabkan karena tidak menyandi protein sehingga mutasi pada daerah ini tidak mempengaruhi fungsi protein dan karenanya perubahan pada D-loop tidak berpengaruh pada fisiologi mitokondria ataupun sel. Variasi antar individu yang relatif tinggi ini menyebabkan D-loop disebut juga daerah *Hypervariable (HV)* dan mempunyai laju mutasi lima kali lebih cepat dibandingkan daerah lain pada genom mitokondria (Greenberg *et al*, 1983). Tingginya rata-rata tingkat mutasi dan kurangnya sekuens penyandi pada regio *hypervariable* membuat regio ini menjadi sumber variasi genetik. Selain itu, karena mtDNA diwariskan secara maternal (sperma tidak memiliki mitokondria), tidak ada rekombinasi mtDNA dari kedua genom orangtua (Jazin *et al*, 1998).

### 1.5 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Reaksi polimerase berantai atau *Polymerase Chain Reaction (PCR)* merupakan suatu proses sintesis enzimatik untuk mengamplifikasi atau memperbanyak nukleotida secara *in vitro* menggunakan enzim *Taq Polymerase*. Metode PCR dapat meningkatkan jumlah urutan DNA hingga  $10^6$  -  $10^7$  kali. Dalam satu siklus PCR, akan diperoleh  $2^n$  kali banyaknya DNA target. Kunci utama pengembangan PCR adalah menemukan bagaimana cara amplifikasi hanya pada urutan DNA target dan meminimalkan amplifikasi urutan non-target (Fatchiyah dkk, 2009).

Penggunaan PCR telah berkembang secara cepat seiring dengan perkembangan biologi molekuler. PCR digunakan untuk identifikasi penyakit genetik, infeksi oleh virus, diagnosis dini penyakit seperti AIDS, *Genetic profiling in forensic, legal and bio-diversity applications*, biologi evolusi, *site-directed mutagenesis of genes* dan mRNA *Quantitation* di sel ataupun jaringan (Fatchiyah dkk, 2009).

Primer memegang peranan penting dalam proses PCR, menurut Sasmito dkk 2014, syarat primer yang baik ditentukan oleh beberapa karakteristik yaitu :

a. *Primer Length*

Proses PCR target suatu gen harus menggunakan 2 jenis primer, yaitu primer forward dan primer reverse. Panjang primer yang ideal memiliki panjang berkisar 16-28 basa.

b. *Primer Melting Temperature*

*Primer melting temperature* ( $T_m$ ) atau suhu leleh primer merupakan temperatur yang diperlukan oleh primer untuk mengalami disosiasi atau lepas ikatan.

c. *Primer Annealing Temperature*

*Primer annealing temperature* ( $T_a$ ) merupakan suhu yang diperkirakan agar primer dapat berikatan dengan templat (DNA) secara stabil. Suhu annealing yang tinggi akan menyulitkan terjadinya ikatan primer sehingga menghasilkan produk PCR yang kurang efisien. Sebaliknya, suhu annealing yang terlalu rendah menyebabkan penempelan primer pada DNA di tempat yang tidak spesifik. Nilai suhu annealing yang sebanding

dengan suhu leleh menyebabkan suhu annealing tidak dimasukkan dalam perhitungan keoptimalan desain primer.

d. *Selisih Primer Melting Temperature*

Primer forward dan primer reverse sebaiknya tidak memiliki selisih suhu leleh yang tinggi. Pasangan primer dengan selisih suhu leleh yang lebih dari 5<sup>0</sup>C menyebabkan penurunan proses amplifikasi atau bahkan memungkinkan tidak terjadi proses amplifikasi.

e. *GC Content*

Jumlah total GC dalam satu untai primer sebaiknya berkisar 40% sampai 60%, karena basa G dan C memiliki tiga ikatan hidrogen sehingga dianggap lebih stabil dalam mengikat templat dibandingkan basa A dan T yang hanya memiliki 2 ikatan hidrogen.

f. *GC Clamp*

GC clamp adalah istilah untuk kondisi dimana ujung 3' pada primer memiliki basa GC. GC Clamp yang dimaksud adalah ujung C, G, CG atau GC yang diyakini membuat hibridasi lebih stabil.

### 2.5.1 Teknik Dasar Amplifikasi PCR

Proses PCR merupakan proses siklus yang berulang meliputi denaturasi, annealing dan ekstensi oleh enzim DNA polimerase. Sepasang primer oligonukleotida yang spesifik digunakan untuk membuat hibrid dengan ujung -5' menuju ujung -3'untai DNA target dan mengamplifikasi untuk urutan yang diinginkan. Dasar siklus PCR ada 30-35 siklus meliputi

- *Denaturation* (95°C), 30 detik

- *Annealing* (55-60°C), 30 detik
- *Extension* (72°C), waktu tergantung panjang pendeknya ukuran DNA yang diinginkan sebagai produk amplifikasi. Peningkatan jumlah siklus PCR diatas 35 siklus tidak memberikan efek yang positif.

#### 2.5.5.1 Denaturasi Untai Ganda DNA

Denaturasi DNA templat umumnya dilakukan selama 30-90 detik, tergantung pada DNA templat yang digunakan. Waktu denaturasi yang terlalu lama akan merusak template DNA dan sekaligus dapat menurunkan aktivitas polimerase DNA. Sedangkan waktu denaturasi yang terlalu pendek akan menyebabkan proses denaturasi tidak sempurna. Suhu denaturasi DNA templat berkisar antara 93-95°C, tergantung pada panjang DNA templat yang digunakan dan panjang fragmen DNA target. Suhu denaturasi yang terlalu tinggi akan menurunkan aktivitas polimerase DNA yang berdampak pada efisiensi PCR. Suhu yang terlalu rendah dapat menyebabkan proses denaturasi DNA templat tidak sempurna. Pada umumnya suhu denaturasi yang digunakan adalah 94°C (Handoyo dan Ari, 2000).

Sekuen target juga mempengaruhi suhu denaturasi untai ganda DNA, jika sekuen target kaya akan Guanin-Sitosin (G-C) maka diperlukan suhu yang lebih tinggi. Suhu denaturasi yang terlalu tinggi dan waktu denaturasi yang terlalu lama mengakibatkan hilangnya atau berkurangnya aktivitas enzim *taq polymerase*. Waktu paruh aktivitas enzim *taq polymerase* adalah >2 jam pada suhu 92,5°C, 40 menit pada suhu 95°C dan lima menit pada suhu 97,5oC (Sulistyaningsih, 2007).



### 2.5.5.2 Primer Annealing

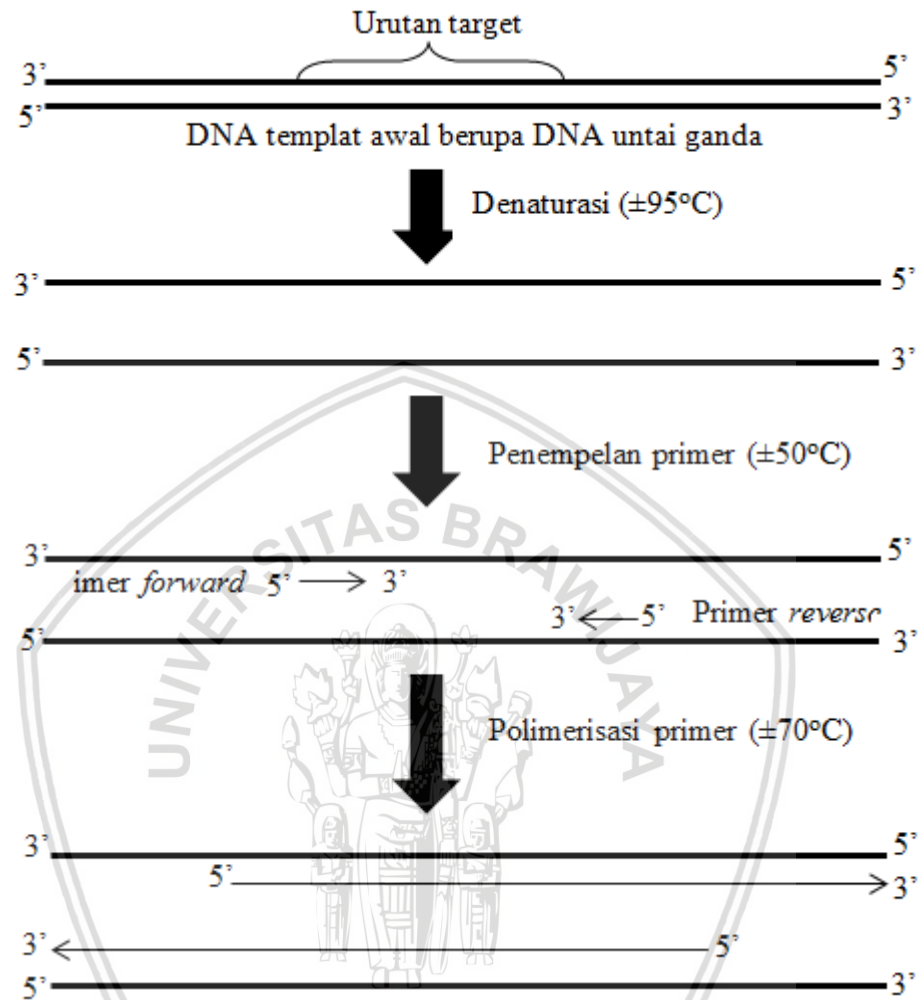
Penentuan waktu untuk proses *annealing* berkaitan dengan panjang primer. Untuk panjang primer 18-22 basa cukup dengan waktu 30 detik, sedangkan untuk panjang primer lebih besar dari 22 basa diperlukan waktu *annealing* 60 detik. Secara umum, suhu *annealing* yang digunakan berkisar antara 37-60°C. pemilihan suhu *annealing* berkaitan dengan  $T_m$  primer yang digunakan untuk proses PCR. Suhu *annealing* yang digunakan dapat dihitung berdasarkan  $(T_m-5)^\circ\text{C}$  sampai dengan  $(T_m+5)^\circ$ . Dalam menentukan suhu *annealing* yang digunakan perlu diperhatikan adanya *mispriming* pada daerah target dan non-target, dan keberhasilan suatu proses PCR akan ditentukan oleh eksperimen (Handoyo dan Ari, 2000).

### 2.5.5.3 DNA Polymerase Extension

Pada tahap *extension* ini terjadi proses pemanjangan untai baru DNA, dimulai dari posisi primer yang telah menempel di urutan basa nukleotida DNA target akan bergerak dari ujung 5' menuju ujung 3' dari untai tunggal DNA. Proses pemanjangan atau pembacaan informasi DNA yang diinginkan sesuai dengan panjang urutan basa nukleotida yang ditargetkan (Fatchiyah, 2008). Pemilihan waktu ekstensi primer tergantung pada panjang fragmen DNA yang akan diamplifikasi. Secara umum untuk mengamplifikasi setiap satu kilo basa DNA diperlukan waktu 30-60 detik. Proses ekstensi primer pada proses PCR selalu dilakukan pada suhu 72°C karena suhu tersebut merupakan suhu optimum



polimerase DNA yang biasa digunakan untuk proses PCR (Handoyo dan Ari, 2000).



Gambar 2.3 Skema satu siklus PCR (Susanto, 2012)

## 1.6 Sekuensing DNA

Sekuensing DNA adalah proses pembacaan urutan nukleotida dari satu fragmen DNA tertentu (Star and Taggart, 2004). Proses sekuensing diawali oleh proses *cycle sequencing*. *Cycle sequencing* adalah proses amplifikasi dengan metode PCR untuk mendapatkan DNA untai tunggal yang akan digunakan

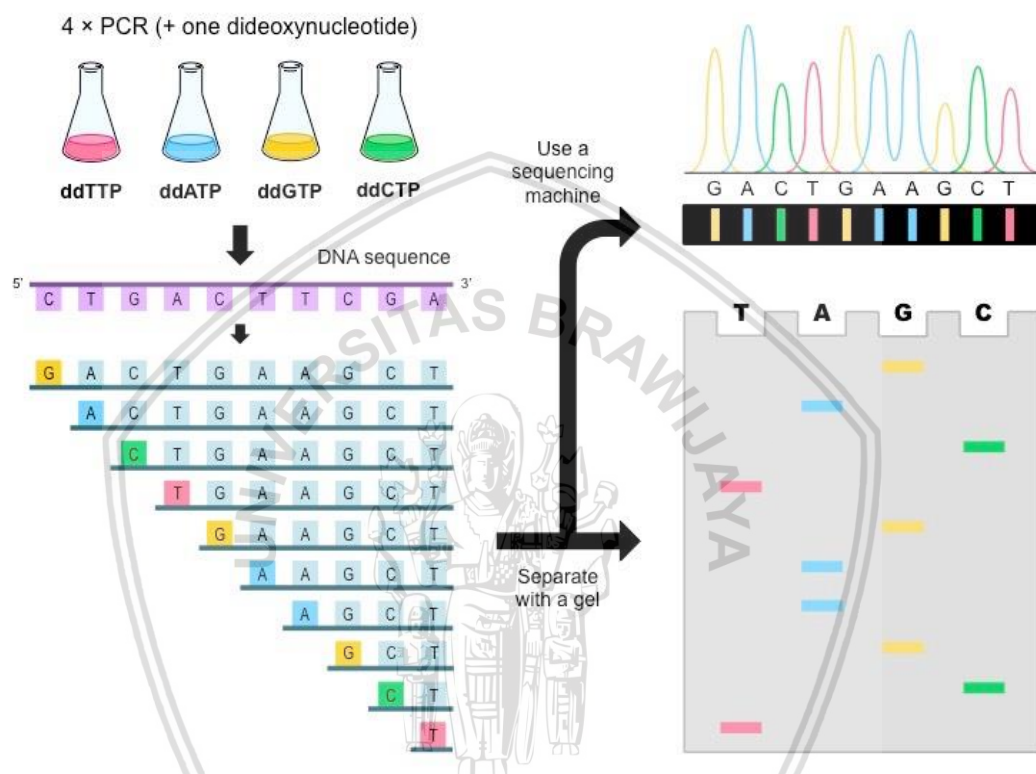
sebagai cetakan (*template*) untuk proses sekuensing (Sambrook *and* Russel, 2001).

Sekuensing DNA bertujuan untuk menentukan urutan basa nitrogen (adenin, guanin, sitosin dan timin) suatu sampel DNA. Salah satu contoh aplikasi teknologi sekuensing DNA yaitu pengurutan genom manusia melalui proyek yang dikenal Human Genome Project. Dalam ilmu pengobatan, sekuensing DNA digunakan untuk mengidentifikasi, mendiagnosis, dan mengembangkan pengobatan penyakit genetik. Tahun 1970 merupakan awal pengembangan sekuensing DNA dengan metode kromatografi. Selanjutnya diperkenalkan metode sekuensing DNA dengan menggunakan metode dye-based sequencing (Olsvik *et al*, 1993).

Metode sekuensing DNA yang pertama kali digunakan adalah metode Sanger (*Sanger dideoxy sequencing*). Metode ini menggunakan DNA templat dan memerlukan primer spesifik untuk reaksi sekuensing. Panjang sekuen yang dihasilkan berkisar antara 1.000–1.200 pasang basa (bp) dan tidak mampu mencapai lebih dari 2.000 bp. Metode Sanger yang disebut juga dengan sekuensing dideoksi dilakukan berdasarkan penggunaan *dideoxynucleotides* (ddNTP's) yang ditambahkan pada nukleotida normal (NTP) yang ditemukan di dalam DNA (Obenrader, 2003).

Skema pada **Gambar 2.4** menunjukkan tahapan sekuensing DNA dengan metode Sanger. 4 campuran PCR disiapkan yang masing masing campurannya mengandung stok basa nukleotida normal dan salah satu dideoksinukleotida (ddA, ddT, ddC atau ddG). Proses PCR akan menghasilkan lebih dari 1 juta molekul DNA, setiap campuran PCR harus menghasilkan semua fragmen terminasi untuk

masing-masing basa dideoksinukleotida. Ketika fragmen dipisahkan menggunakan gel elektroforesis, sekuen basa nukleotida dapat ditentukan dengan mengurutkan fragmen menurut panjang sekuennya. Jika primer berlabel fluorescence dicampurkan dalam campuran PCR, maka deteksi fragmen dapat dilakukan secara otomatis menggunakan mesin sekuensing (Bioninja, 2017).



**Gambar 2.4** Skema sekuensing DNA metode Sanger (Bioninja.com, 2017)

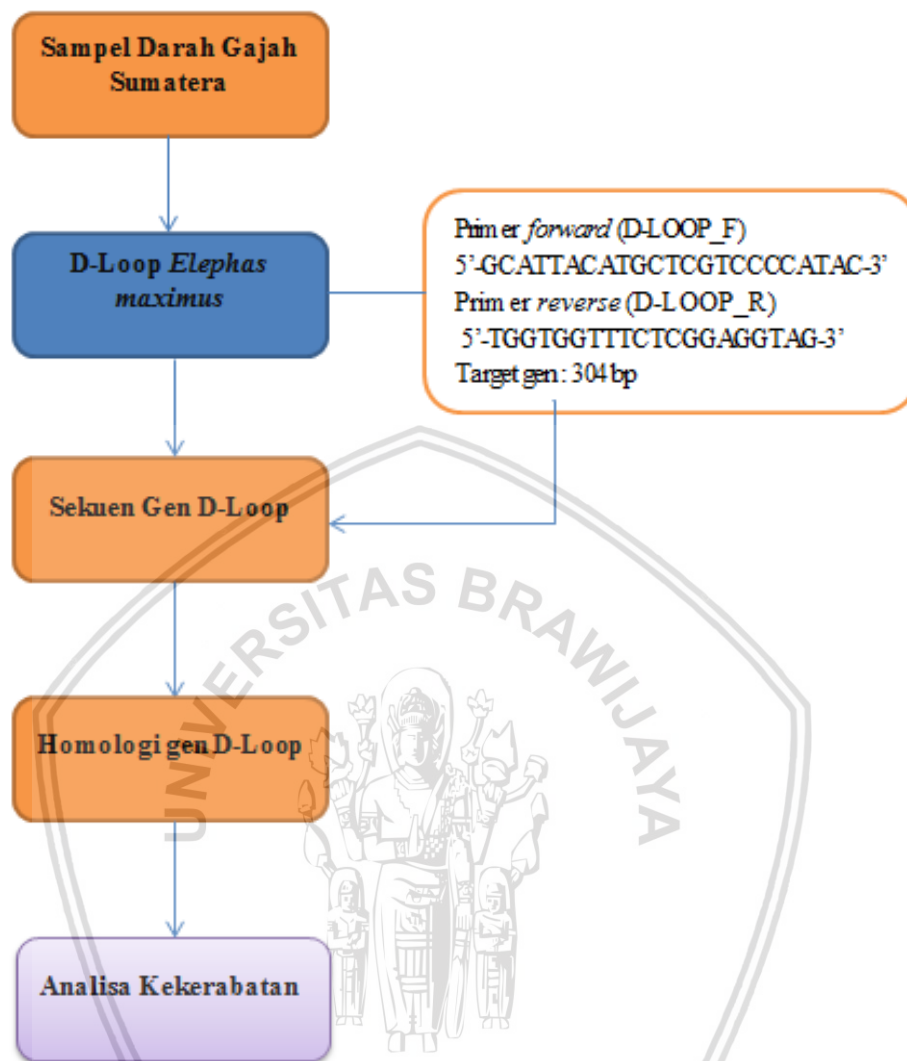
## BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

### 3.1 Kerangka Konseptual

Kekerabatan Gajah Sumatera dapat diketahui dengan melihat ekspresi gen D-Loop. Daerah ini sering digunakan untuk analisis filogenetik dalam spesies yang dapat menentukan kekerabatan genetik antar spesies serta dapat mengelompokkan gen individu dalam suatu keluarga yang menggambarkan bagaimana gen dapat berhubungan antar spesies dalam satu keluarga. Selain melihat kekerabatan antar Gajah Sumatera, juga dilakukan analisa kekerabatan dengan Gajah Afrika untuk mengetahui tingkat kekerabatan antar dua spesies yang berbeda secara morfologi dan daerah asal tersebut. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Hauf *et al* (2000) didapatkan sekuens genom mitokondria lengkap dari Gajah Afrika. Analisa kekerabatan dengan Gajah Afrika dilakukan dengan menyejajarkan sekuens gen yang didapatkan dengan data *genebank* pada NCBI dengan kode referensi sekuens NC\_000934.1.

Sampel darah dapat digunakan untuk melihat sekuen gen D-loop. Amplifikasi DNA dilakukan secara *in vitro* dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) yang membutuhkan sepasang primer *forward* dan primer *reverse*. Hasil sekuen DNA disejajarkan menggunakan algoritma *ClustalW multiple alignment* dan dianalisa kekerabatannya secara deskriptif dari hasil pengolahan perangkat lunak MEGA versi 7.0 dengan metode bootstrapped Neighbor-Joining (NJ).

### 3.2 Bagan Kerangka Konseptual



Gambar 3.1 Bagan Kerangka Konseptual

### 3.3 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah yang telah ada, maka hipotesis yang dapat diajukan adalah sebagai berikut : Gajah Sumatera yang berasal dari daerah yang sama berkerabat lebih dekat satu sama lain dan memiliki perbedaan dengan Gajah Afrika berdasarkan sekuen gen D-Loop dengan menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

## BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

### 4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Pengambilan sampel darah Gajah Sumatera dilakukan di Taman Safari Indonesia 2 Prigen, Pasuruan Jawa Timur. Penelitian dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) dan Laboratorium Biosains Universitas Brawijaya Malang pada bulan Februari – Juni 2017.

### 4.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian antara lain kandang jepit, *disposable syringe*, sarung tangan, masker, *ice box*, kertas label, tabung EDTA, *microcentrifuge tube* (1,5 mL), *micro PCR tube* (200 µl), mikropipet, *white tip*, *yellow tip*, mesin vortex, sentrifugator, mesin penangas, inkubator, *freezer*, timbangan analitik digital, *thermocycler*, mesin *sequencing*, komputer, *Bio Step UV-Transilluminator* DH-40, ND-1000 *Spectrophotometer*, Mupid-Exu *Electrophoresis*, kamera dan tisu.

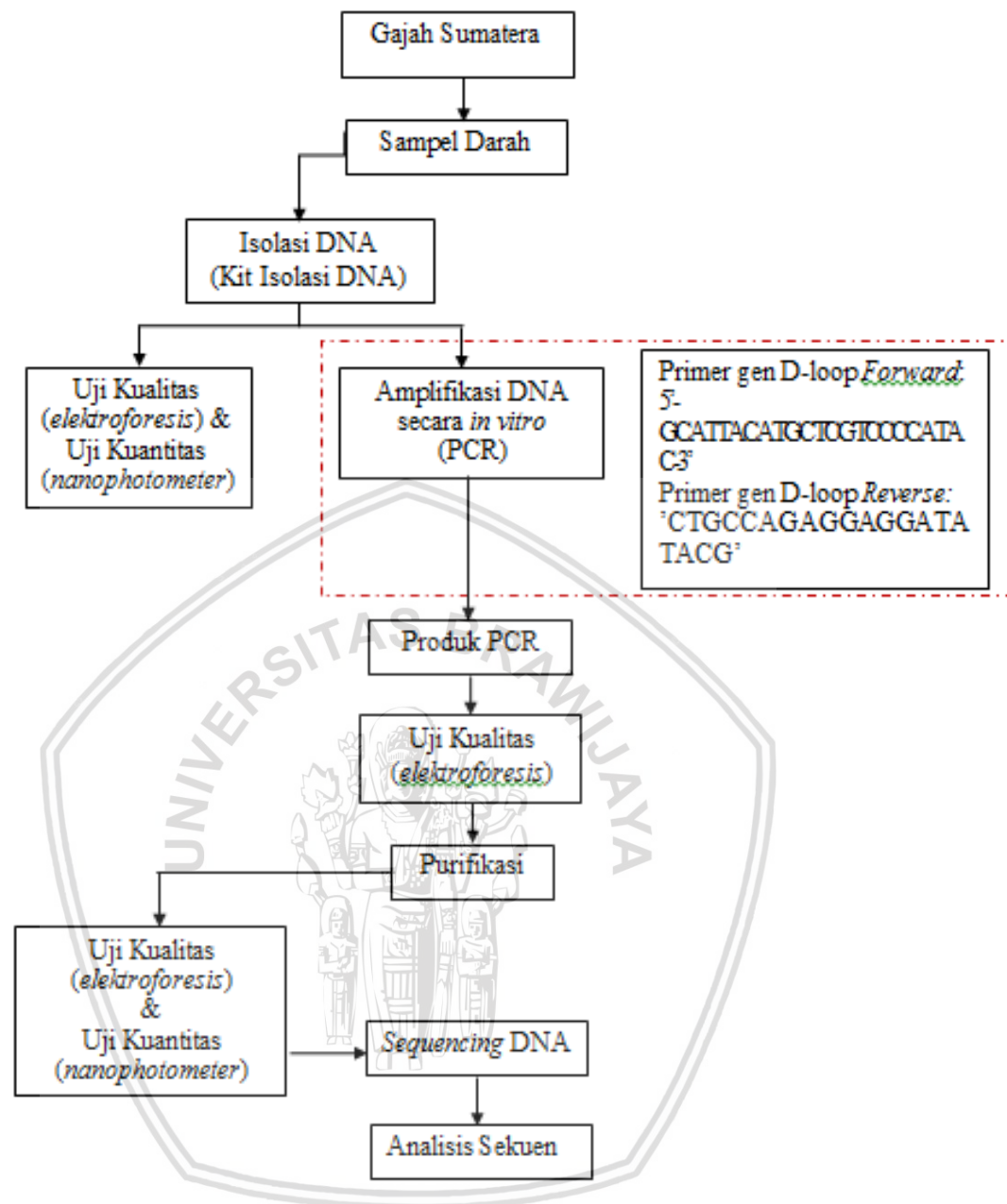
Bahan yang digunakan dalam penelitian yaitu 2 sampel darah Gajah Sumatera jantan dan 2 sampel darah Gajah Sumatera betina dewasa yang berasal dari Lampung, *DeRiPRO 3-In-1 Extraction Kit*, ddH<sub>2</sub>O, primer *forward* (D-LOOP\_F) 5'-GCATTACATGCTCGTCCCCATAC-3' dan primer *reverse* (D-LOOP\_R) 5'-TGGTGGTTTCTCGGAGGTAG-3', PCR *mix* (Promega *Gotaq Green Master Mix*), DNA *ladder* 100 bp dan 1 kb, Tris Borat EDTA (TBE 1 x), agarosa 1% dan 2%, *loading dye*, ethanol absolut, alkohol 70%, aluminium foil, larutan etidium bromida (EtBr) dan natrium asetat 3M.

#### 4.3 Tahapan Penelitian

Tahapan penelitian yang dilakukan adalah sebagai berikut :

1. Pemilihan sampel darah Gajah Sumatera di Taman Safari Indonesia 2  
Prigen, Jawa Timur
2. Pengambilan sampel berupa darah Gajah Sumatera asal Lampung
3. Isolasi DNA
4. Uji kuantitas dan kualitas DNA total
5. Desain primer
6. *Polymerase Chain Reaction* (PCR)
7. Uji kuantitas dan kualitas produk PCR
8. Purifikasi produk PCR
9. Sekuensing DNA produk PCR
10. Analisa data





**Gambar 4.1** Kerangka Operasional Penelitian

#### 4.4 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian studi kasus yang dianalisa secara deskriptif, yaitu dengan mendeskripsikan hasil analisa data. Data diperoleh dari sekuen DNA D-loop untuk merekonstruksi pohon filogenetik dalam menentukan kekerabatan antara Gajah Sumatera dan Gajah Afrika. Sebanyak empat sampel darah yang diuji merupakan darah dari spesies Gajah Sumatera (*Elephas maximus sumatranus*) sebanyak 3 cc setiap individu. Kemudian dilakukan isolasi DNA melalui sampel darah tersebut dengan menggunakan *DeRiPRO 3-In-1 Extraction Kit*. Hasil isolasi DNA tersebut kemudian diukur konsentrasinya menggunakan nanospektrofotometri dan ukurannya dengan elektroforesis gel agarosa 1%. Setelah itu, sampel DNA diamplifikasi dengan PCR menggunakan sepasang primer *forward* (D-LOOP\_F) 5'-GCATTACATGCTCGTCCCCATAC-3' dan primer *reverse* (D-LOOP\_R) 5'-TGGTGGTTTCTCGGAGGTAG-3'. Untuk mengetahui ukuran fragmen produk PCR diukur dengan elektroforesis gel agarosa 2%. Produk PCR kemudian di sekuensing. Hasil sekuensing fragmen DNA kemudian dianalisis dengan menggunakan program *BioEdit*, BLAST NCBI dan MEGA versi 7.0 serta dianalisa secara deskriptif.

#### 4.5 Prosedur Kerja

##### 4.5.1 Pemilihan Gajah Sumatera

Gajah Sumatera yang digunakan berasal dari TSI II Prigen di Pasuruan Jawa Timur. Pemilihan Gajah Sumatera dilakukan berdasarkan kesamaan daerah asal Gajah Sumatera yaitu Lampung yang belum diketahui hubungan kekerabatan individualnya satu sama lain. Gajah Sumatera yang digunakan sebagai sampel

telah mencapai usia dewasa yaitu lebih dari 30 tahun sehingga siap digunakan sebagai indukan. Sampel yang diambil berupa 2 individu jantan dan 2 individu betina. Tabel 4.1 menunjukkan informasi individu sampel Gajah Sumatera.

**Tabel 4.1 Informasi Individu Sampel Gajah Sumatera**

No	Nama	Umur (Tahun)	Jenis Kelamin	Asal	Simbol
1	Subaru	55	Jantan	Lampung	Y1
2	Bondan	30	Jantan	Lampung	Y2
3	Mega	47	Betina	Lampung	Y3
4	Nebi	48	Betina	Lampung	Y4

#### 4.5.2 Pengambilan Sampel Darah Gajah Sumatera

Lokasi pengambilan sampel darah dilakukan pada vena auricularis. Volume sampel darah yang diambil sebanyak 3cc dari masing-masing empat individu Gajah Sumatera. Sampel darah dimasukkan ke dalam EDTA *vacutainer tube* dan di label sesuai nama individu Gajah Sumatera. Sampel kemudian disimpan pada suhu 4°C. Penyimpanan sampel *whole blood* pada suhu 4°C dipilih karena jarak antara pengambilan sampel dan proses isolasi DNA tidak terlalu lama (Bulla *et al*, 2016).

#### 4.5.3 Isolasi DNA

Isolasi DNA dari sampel darah Gajah Sumatera menggunakan *DeRiPRO 3-In-1 Extraction Kit* mengikuti protokol isolasi DNA dari darah dengan terlebih

dahulu dilakukan pemisahan *buffy coat* untuk mendapatkan leukosit. Terdapat 3 langkah utama dalam isolasi DNA, yaitu merusak dinding sel atau lisis, pemisahan DNA dari bahan padat seperti selulosa dan protein serta pemurnian DNA. Protokol dari isolasi DNA dari sampel darah dapat dilihat pada **lampiran 1**.

#### 4.5.4 Uji Kuantitas dan Kualitas DNA

##### 4.5.4.1 Uji Kuantitas DNA

Uji kuantitas DNA hasil isolasi dilakukan dengan menggunakan mesin ND-1000 *Spectrophotometer*. Blanko yang digunakan adalah ddH<sub>2</sub>O. ddH<sub>2</sub>O ditetaskan langsung diatas *pedestal submicroliter cell* sebanyak 1 µL, selanjutnya absorbansi blanko diukur dengan menekan tombol *blank* setelah *lid* (penutup) ditutupkan. Panjang gelombang yang digunakan adalah 260 nm dan 280 nm. Sebanyak 1 µL sampel ditetaskan diatas pedestal submicroliter cell yang telah dibersihkan. *Lid* ditutup diatas sampel yang telah ditetaskan dan ditekan tombol *sample* kemudian ditunggu hingga hasilnya keluar di layar monitor. (Nanodrop Technologies, 2007).

##### 4.5.4.2 Uji Kualitas DNA

Uji kualitas isolasi DNA dilakukan dengan menggunakan gel elektroforesis agarosa 1% dengan tujuan untuk mengetahui regio DNA target yang menjadi cetakan untuk gen D-Loop. Uji kualitas DNA dilakukan dengan menggunakan mesin Mupid-Exu *Electrophoresis*. Elektroforesis gel agarosa 1% dilakukan sesuai Sambrook and Russel (2001). Dibersihkan cetakan agarosa dan diletakkan secara horizontal, selanjutnya dipanaskan TBE 1x dengan volume 15 ml dan gel agarosa 1% (0,15 g) hingga mendidih atau agarosa larut. Menurut Fatchiyah dkk.,

2009 campuran selanjutnya ditambahkan larutan EtBr sebanyak 1 $\mu$ l dan didinginkan (tidak sampai memadat), kemudian disiapkan sisir dan *plate* untuk membentuk sumuran. Campuran agarosa, TBE 1x dan EtBr kemudian dituangkan ke dalam cetakan dan dipastikan tidak terdapat gelembung udara di area sisir yang digunakan. Gel didiamkan selama 20-30 menit pada suhu kamar hingga memadat baru kemudian diambil sisir secara perlahan. Gel dengan sumuran yang telah terbentuk kemudian dimasukkan ke dalam *chamber* Mupid-Exu *Electrophoresis*. Kemudian larutan buffer elektroforesis (*running* TBE 1x) dituangkan kedalam *chamber* hingga menutupi seluruh bagian gel. *Marker* (DNA ladder) dan *loading dye* (1:1) dimasukkan ke dalam salah satu sumuran. Campuran larutan *loading dye* dan DNA (1:1) kemudian dimasukkan kedalam sumur selanjutnya. *Chamber* dihubungkan dengan *power supply* dan dinyalakan dengan tegangan 100 volt selama 30 menit. Setelah *running* gel elektroforesis selesai arus listrik diputuskan dan gel diangkat dari *chamber*. Gel selanjutnya dipindahkan ke *UV-transilluminator gel doc* dan diamati hasilnya. Hasil didokumentasikan dan diekspos dengan *gel doc imaging* sehingga memudahkan analisis (Fatchiyah dkk, 2009).

#### 4.5.5 Desain Primer

Primer yang digunakan dalam amplifikasi DNA dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) di desain menggunakan NCBI *Genebank* : AJ224733.1. Primer *forward* dan primer *reverse* didapatkan melalui *primer3plus* dengan menggunakan data AJ224733.1 419 bp DNA linear. *Elephas maximus mitochondrial DNA for partial D-loop, clone 1*. Sepasang sekuen primer yang didapatkan adalah primer *forward* (D-LOOP\_F) 5'-

GCATTACATGCTCGTCCCCATAC-3' (*start*: 30; *length* : 23 bp;  $T_m$  : 57,9°C; GC : 52,2%) dan primer *reverse* (D-LOOP\_R) 5'-TGGTGGTTTCTCGGAGGTAG-3' (*start*: 356; *length* : 20 bp;  $T_m$  : 56,2°C; GC : 55 %) dengan target produk PCR 327 bp. Tata cara desain primer dapat dilihat pada **lampiran 2**.

#### 4.5.6 Proses Polymerase Chain Reaction (PCR)

Sampel DNA dari Gajah Sumatera diamplifikasi dengan menggunakan metode PCR. Sepasang primer yang digunakan adalah primer *forward* (D-LOOP\_F) dan *reverse* (D-LOOP\_R). Amplifikasi dimulai dengan cara mencampurkan 1  $\mu$ L DNA, 1  $\mu$ L primer *forward* 10pmol, 1  $\mu$ L primer *reverse* 10pmol, 5  $\mu$ L PCR mix dan 2  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O ke dalam mikrotube 200  $\mu$ L. Tahapan amplifikasi dimulai dari predenaturasi 94°C selama empat menit, denaturasi 94°C selama 30 detik, kemudian annealing pada suhu 53,5°C selama 30 detik. Extension pada suhu 72°C selama 1 menit dan post extension pada 72°C selama 7 menit. Proses akan berulang selama 35 siklus.

#### 4.5.7 Uji Kuantitas dan Kualitas Produk PCR

Pengujian kuantitas produk PCR sama dengan uji kuantitas isolat DNA. Untuk memvisualisasikan produk PCR gen D-LOOP dari darah Gajah Sumatera, kemudian dilanjutkan dengan *running* elektroforesis gel agarosa. Pada dasarnya pengujian kualitas produk PCR sama dengan menguji kualitas isolat DNA. Sebanyak 2  $\mu$ L produk PCR ditambahkan 2  $\mu$ L *loading dye* dan dicampurkan homogen di dalam PCR tube. Produk PCR tersebut dipipet ke dalam sumur gel agarosa 2% dengan TBE 1x pada voltase 100V, selama 30 menit. Kemudian



didokumentasikan hasil elektroforesis dengan kamera digital pada UV-transiluminator.

#### 4.5.8 Purifikasi Produk PCR

Purifikasi pada produk PCR bertujuan untuk memurnikan DNA dan menghilangkan sisa-sisa PCR mix meliputi dNTPs, Taq Polimerase, ion Mg, serta ddH<sub>2</sub>O dan primer yang berada didalam PCR tube. Metode yang digunakan dalam purifikasi adalah presipitasi etanol dengan modifikasi protokol *Santella*. Protokol purifikasi dapat dilihat pada **Lampiran 3**.

#### 4.5.9 Sekuensing DNA

Sekuensing produk PCR dari gen D-LOOP dilakukan dua arah yaitu dengan menggunakan primer D-LOOP\_F 10pmol dan D-LOOP\_R 10 pmol untuk melihat sekuen Gen D-LOOP sebesar 327 bp yang teramplifikasi dengan menggunakan metode *dye terminator*. Konsentrasi DNA produk PCR minimal 50ng/μL untuk dapat dilakukan sekuensing. Hasil sekuensing berupa grafik yang menyatakan kandungan adenin, timin, guanin dan sitosin yang terdapat pada fragmen DNA yang telah dilabel oleh ddNTPs

#### 4.5.10 Analisa Data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian ini kemudian dilakukan pembahasan secara kualitatif dengan mendeskripsikan kekerabatan antara empat Gajah Sumatera di TSI dan Gajah Afrika melalui homologi gen D-Loop dengan menggunakan software *BioEdit* dan BLAST NCBI. Tahap analisis DNA dilakukan dengan penyejajaran sekuen DNA dengan membandingkan antara



sampel Y1, Y2, Y3 dan Y4 dengan database NCBI *Genebank* : AJ224733.1. penyejajaran menggunakan algoritma *ClustalW multiple alignment*. Analisis filogeni menggunakan perangkat lunak MEGA versi 7.0 dengan metode bootstrapped Neighbor-Joining (NJ) memakai 1000 kali pengulangan. Hasil analisis program MEGA tersebut akan diperoleh matriks jarak genetik persamaan basa nukleotida.



## BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

### 5.1 Isolasi DNA dari Darah Gajah Sumatera

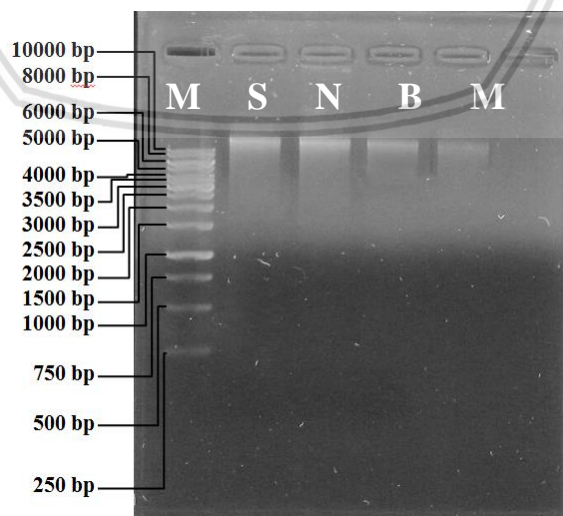
Isolasi DNA dilakukan menggunakan sampel *wholeblood* yang dikerjakan dengan *DeRiPRO™ 3-In-1 Extraction Kit* sesuai protokol yang terlampir pada **Lampiran 1**. Hasil yang didapatkan ialah DNA total yang selanjutnya dilakukan uji kuantitas dan kualitas. Uji kuantitas dilakukan dengan menggunakan mesin ND-1000 *Spectrophotometer* dengan panjang gelombang 260 nm. DNA total hasil isolasi tersebut selanjutnya dapat digunakan sebagai DNA template untuk proses amplifikasi gen D-loop pada genome mitokondria dari gajah Sumatera dengan teknik PCR untuk mengetahui kekerabatan gajah Sumatera yang berasal dari Lampung.

**Tabel 5.1** Konsentrasi dan Kemurnian DNA Gajah Sumatera

Sampel	Konsentrasi (ng/ $\mu$ L)	Kemurnian (260/280)
Subaru	10.00	2.14
Nebi	23.43	1.81
Bondan	8.42	1.94
Mega	12.88	1.50

Berdasarkan hasil uji kuantitas pada **Tabel 5.1** tersebut diketahui bahwa DNA total hasil isolasi dari gajah Sumatera Nebi dan Bondan memiliki tingkat kemurnian yang bagus yaitu dalam rentang 1,8 – 2,0. Menurut Sambrook and Russel (2006), hasil isolasi DNA murni apabila nilai absorbansi gelombang 260/280 bernilai 1,8-2,0. Sedangkan pada gajah Sumatera Subaru dengan tingkat kemurnian diatas 2,0 dapat disebabkan oleh kontaminasi RNA sedangkan gajah

Sumatera Mega yang memiliki nilai dibawah 1,8 disebabkan oleh kontaminasi protein. Menurut Nanodrop Technologies (2007), rasio absorbansi pada gelombang 260 nm dan 280 nm digunakan untuk melihat kemurnian DNA dan RNA. Rasio yang berkisar 1,8 secara umum dapat dikatakan sebagai DNA murni, sedangkan rasio berkisar 2,0 dapat dikatakan sebagai RNA murni. Jika rasio yang didapatkan lebih rendah dari nilai tersebut, maka dapat di indikasikan adanya kontaminasi protein, phenol atau kontaminan lain yang dapat menyerap dengan kuat gelombang 280 nm. Konsentrasi yang didapatkan dari uji kuantitas juga beragam, namun secara prinsip amplifikasi DNA dengan PCR dapat dilakukan meskipun hanya dengan 1 untai ganda gen target. Menurut Somma *and* Querci (2006) jumlah minimum DNA yang dapat digunakan dalam PCR adalah 0.05 – 1.0 µg. Hasil isolasi DNA total juga di uji secara kualitas menggunakan elektroforesis dengan konsentrasi agarose 1%. Hasil gel elektroforesis agarose 1% dapat dilihat pada **Gambar 5.1**. Hasil gel elektroforesis menunjukkan adanya *band* di atas marker 10.000 bp, hal ini menunjukkan bahwa DNA yang terisolasi memiliki ukuran diatas 10.000 bp.



**Gambar 5.1** Hasil Elektroforesis DNA Total (Agarose 1%)

Keterangan : M : Marker 1 kb, S : Subaru, N : Nebi, B : Bondan, M : Mega. Uji Kualitas 4 DNA total hasil isolasi menggunakan kit DeRiPro menunjukkan pita di atas marker 10.000 bp.

## 5.2 Amplifikasi Gen D-loop dengan Metode PCR

Amplifikasi gen D-loop dilakukan untuk memperbanyak fragmen gen D-loop sehingga dapat digunakan untuk mengetahui adanya similaritas antara sekuen DNA gajah Sumatera asal Lampung yang berada di TSI II Prigen dengan gajah Asia dan gajah Afrika. Primer yang digunakan dalam program PCR didesain dari *genebank* NCBI dengan *reference sequence* : AJ224733.1 menggunakan *Primer3plus*, sehingga didapatkan sepasang primer *forward* dan *reverse* yang ditunjukkan pada **Tabel 5.2**. Program PCR yang digunakan dalam penelitian ini meliputi tahap pradenaturasi, denaturasi, *annealing*, ekstensi dan post-ekstensi dengan waktu dan suhu yang dipaparkan pada **Tabel 5.3**. Susunan basa nitrogen dari gen D-loop dengan primer yang telah di desain ditunjukkan pada **Gambar 5.2**.

**Tabel 5.2** Urutan Oligo Nukleotida Primer gen D-loop Gajah Sumatera

Primer	Urutan Oligo Nukleotida
<i>Forward</i> (D-LOOP_F)	5'-GCATTACATGCTCGTCCCCATAC-3'
<i>Reverse</i> (D-LOOP_R)	5'-TGGTGGTTTCTCGGAGGTAG-3'

**Tabel 5.3** Program PCR untuk Amplifikasi gen D-loop Gajah Sumatera

Kondisi	Waktu	Suhu
Pradenaturasi	4 menit	94°C
Denaturasi	30 detik	94°C
<i>Annealing</i>	30 detik	53,5°C
Ekstensi	1 menit	72°C
<i>Post</i> Ekstensi	7 menit	72°C

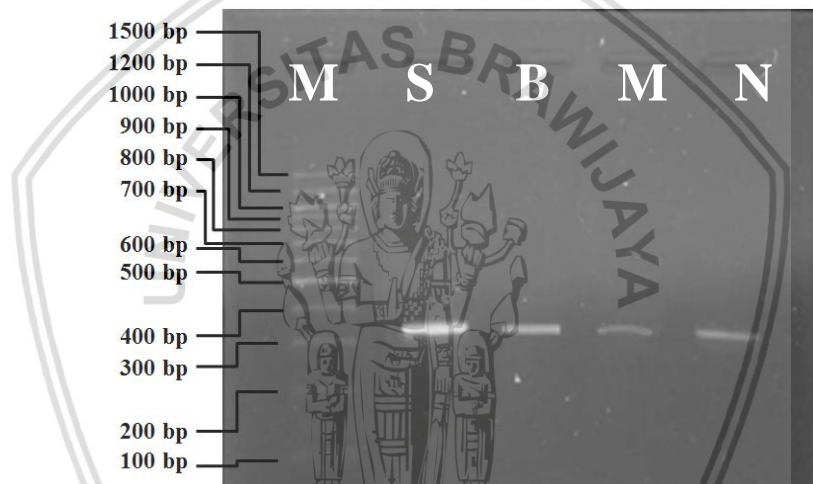
```

1   caaacgaatc agtttgctat gtacatcgtg cattacatgc tcgtcccat acataatgat
61  atataatact aactatactt aatcttacat agaccatacc atgtataatc gtgcatcaca
121 ttatttacc ccatgcttata agcaagtact gtttagtcaa tgtgtcaagt catattagt
181 tagattcaca ggttatgttc tggttcatgg atattgttca cctacgataa accatagtcc
241 tacatagcac attaaagctc ttgatcgtac atagcgcat actgagaaat ttctagtcat
301 catgcataat acctccaacg gttgtatctt aactac ctac ctccgagaaa ccacca accc
361 gcccatcttc gtgtccctct tctcgtctcg ggcccatcaa ttgtgggggt ttctatact

```

**Gambar 5.2** *Origin* Oligo Nukleotida Gen D-loop Keterangan : Kuning : Primer *forward* D-loop, Hijau Primer *reverse* D-loop, Abu-abu : *Region of interest*

Produk PCR di uji secara kualitatif dan didapatkan adanya pita DNA dengan ukuran 327 bp sesuai dengan target amplifikasi menggunakan primer *forward* dan *reverse* yang telah di desain. Hasil elektroforesis produk PCR konsentrasi agarose 2% dapat dilihat pada **Gambar 5.3**

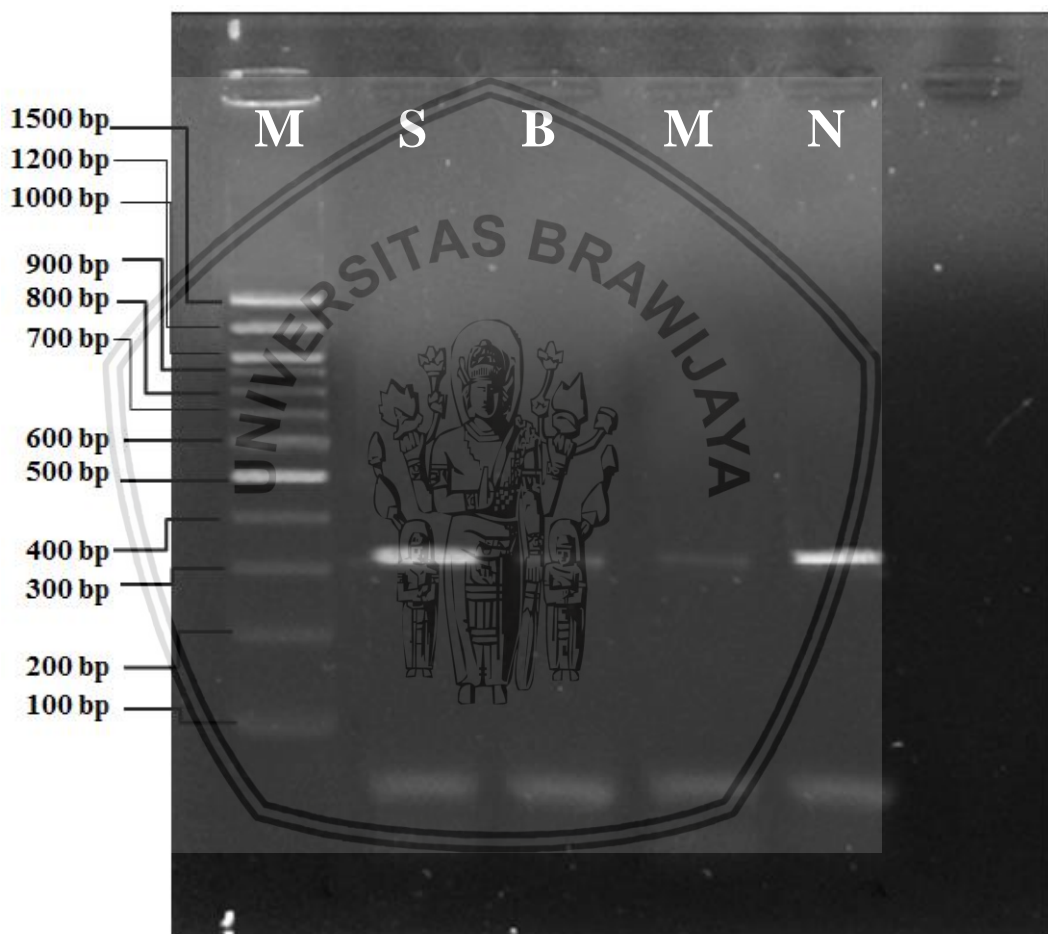


**Gambar 5.3** Hasil Elektroforesis Produk PCR Konsentrasi Agarose 2% Keterangan : M : Marker 100 bp, S : Subaru, B : Bondan, M : Mega, N : Nebi. Uji kualitas 4 produk PCR menunjukkan adanya pita diatas marker 300 bp.

Produk PCR tersebut kemudian di purifikasi agar didapatkan gen D-loop yang murni, hasil purifikasi kembali di uji secara kualitas dan kuantitas agar dapat dilanjutkan ke tahap sekuensing DNA. Uji kualitas hasil purifikasi dilakukan dengan elektroforesis agarosa 2% sedangkan uji kuantitas dilakukan dengan mesin ND-1000 *Spectrophotometer*. Hasil uji kuantitas dan kualitas hasil purifikasi ditunjukkan pada **Tabel 5.4**.

**Tabel 5.4** Konsentrasi dan Kemurnian Purifikasi Produk PCR

Sampel	Konsentrasi (ng/ $\mu$ L)	Kemurnian (260/280)
Subaru	36.37	1.76
Bondan	42.38	1.61
Mega	29.58	1.77
Nebi	28.46	1.71

**Gambar 5.4** Hasil Elektroforesis Purifikasi Produk PCR Agarosa 2%

Keterangan : M : Marker 100 bp, S : Subaru, B : Bondan, M : Mega, N : Nebi. Hasil purifikasi produk PCR menunjukkan pita tetap berada diatas marker 300 bp, dengan pita paling jelas pada sampel Subaru dan Nebi.

Berdasarkan **Tabel 5.4** dapat diketahui konsentrasi dan kemurnian masing masing hasil purifikasi dari 4 Gajah Sumatera di TSI II. Semua hasil purifikasi



produk PCR menunjukkan nilai yang lebih rendah dari 1.8. Hasil purifikasi produk PCR dari gajah Sumatera Subaru memiliki nilai kemurnian paling tinggi yaitu 1.76 dengan konsentrasi 36.37 ng/ $\mu$ L, sedangkan untuk gajah Sumatera Bondan memiliki nilai kemurnian hasil purifikasi paling rendah yaitu 1.61 dengan konsentrasi 42.38 ng/ $\mu$ L. Nilai absorbansi di bawah standar DNA yaitu 1.8 mengindikasikan adanya kontaminasi protein di dalam hasil purifikasi tersebut.

Pada **Gambar 5.4** terlihat adanya visualisasi pita dengan ukuran fragmen 327 bp pada hasil elektroforesis purifikasi produk PCR, pita tersebut sesuai dengan target gen D-loop yang diinginkan. Hal ini membuktikan bahwa gen D-loop telah berhasil di amplifikasi secara spesifik dan hasil purifikasi produk PCR siap di sekuensing.

### 5.3 Sekuensing Gen D-loop

Hasil purifikasi produk PCR yang dipilih untuk sekuensing adalah sampel gajah Sumatera Subaru dan gajah Sumatera Nebi, pemilihan tersebut berdasarkan uji kuantitas dan kualitas hasil purifikasi produk PCR. Sekuensing DNA dilakukan dengan metode dideoksi Sanger menggunakan Automatic DNA sequencer yang berdasarkan pada metode dye terminator labelling. Hasil sekuensing di baca menggunakan software Bioedit 7.2.5 dengan menggunakan system operasi Windows 8.

Hasil sekuensing DNA berupa grafik elektroferogram (grafik yang menunjukkan basa-basa yang terekam pada hasil sekuensing) dan data dalam format fasta (urutan basa-basa hasil sekuensing). Masing-masing hasil sekuensing sampel di masukkan ke program BLAST NCBI untuk mengetahui kesejajaran basa nitrogen hasil sekuensing dengan database NCBI. Hasil penyejajaran dapat



dilihat pada **Gambar 5.5** untuk sampel gajah Sumatera Subaru dan **Gambar 5.6** untuk sampel gajah Sumatera Nebi.

Hasil sekuensing dari gen d-loop gajah Sumatera Subaru memiliki query coverage 99% dan ident 99% terhadap NCBI Genebank : KX882122.1, sedangkan sampel gajah Sumatera Nebi memiliki nilai yang lebih rendah yaitu query coverage 97% dan ident 98%. Hasil tersebut menunjukkan bahwa baik sampel gajah Sumatera Subaru maupun sampel gajah Sumatera Nebi memiliki kemiripan yang identik dengan DNA target yang diinginkan yaitu gen d-loop spesies Gajah Asia (*Elephas maximus*). Urutan hasil sekuen pada sampel gajah Sumatera Subaru menunjukkan adanya kesejajaran pada basa ke 51 sampai 332 dari database NCBI, sedangkan pada sampel gajah Sumatera Nebi menunjukkan adanya kesejajaran dari basa ke 41 sampai 332 dari database NCBI.

☐
[Elephas maximus haplotype HT16 D-loop, partial sequence; mitochondrial](#)

499
499
99%
1e-137
99%
[KX882122.1](#)

Download
GenBank
Graphics

Elephas maximus haplotype HT16 D-loop, partial sequence; mitochondrial
Sequence ID: [KX882122.1](#)
Length: 563
Number of Matches: 1

Range 1: 51 to 332
[GenBank](#)
[Graphics](#)

Next Match
Previous

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
499 bits(270)	1e-137	278/282(99%)	0/282(0%)	Plus/Plus
Query 1	TACTTAATCTTACATAGACCATACTATGTATAATCGTGCATCATTATTACCCCATGC	60		
Sbjct 51	TACTTAATCTTACATAGACCATACTATGTATAATCGTGCATCATTATTACCCCATGC	110		
Query 61	TTATAAGCAAGCACTGTTTAATCAATGTGTTAAGTCATATTCTTGTAGATTACAGGTTA	120		
Sbjct 111	TTATAAGCAAGTACTGTTTAATCAATGTGTTAAGTCATATTCTTGTAGATTACAGGTTA	170		
Query 121	TGTTTGTAGTTCATGGATATTATTACCTACGATAAACCATAGTCTTACATAGCACATTAA	180		
Sbjct 171	TGTTTGTAGTTCATGGATATTATTACCTACGATAAACCATAGTCTTACATAGCACATTAA	230		
Query 181	AGCTCTTGATCGTGCATAGCGCATTACTGAGAAATCTCTAGTCATCATGCATATCACCTC	240		
Sbjct 231	AGCTCTTGATCGTGCATAGCGCATTACTGAGAAATCTCTAGTCATCATGCATATCACCTC	290		
Query 241	CAACGGTTGTACCTTAACCTACCTACCTCCGAGAAACCA	282		
Sbjct 291	CAACGGTTGTACCTTAACCTACCTACCTCCGAGAAACCATCA	332		

**Gambar 5.5 Hasil BLAST gen D-loop nukleotida sampel Subaru (Query)**  
 terhadap urutan nukleotida dari Database NCBI dengan *sequence* ID: KX882122.1  
 Keterangan : 99% : *Query coverage*, 99% : *Ident*

[Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#)

Elephas maximus haplotype HT16 D-loop, partial sequence; mitochondrial

Sequence ID: [KX882122.1](#) Length: 563 Number of Matches: 1Range 1: 41 to 332 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
510 bits(276)	7e-141	287/292(98%)	1/292(0%)	Plus/Plus
Query 9	ATACT-ACTATACTTAATCTTACATAGACCATACTATGTATAATCGTGCATCACATTATT	67		
Sbjct 41	ATACTAACTATACTTAATCTTACATAGACCATACTATGTATAATCGTGCATCACATTATT	100		
Query 68	TACCCCATGCTTATAAGCAAGCACTGTTTAATCAATGTGTTAAGTCATATTCTTGTAGAT	127		
Sbjct 101	TACCCCATGCTTATAAGCAAGCACTGTTTAATCAATGTGTTAAGTCATATTCTTGTAGAT	160		
Query 128	TCACAGGTTATGTTTGTAGTTCATGGATATTATTACCTACGATAAACCATAGTCTTACAT	187		
Sbjct 161	TCACAGGTTATGTTTGTAGTTCATGGATATTATTACCTACGATAAACCATAGTCTTACAT	220		
Query 188	AGCACATTAAAGCTCTTGATCGTGCATAGCGCATTACTGAGAAATCTCTAGTCATCATGC	247		
Sbjct 221	AGCACATTAAAGCTCTTGATCGTGCATAGCGCATTACTGAGAAATCTCTAGTCATCATGC	280		
Query 248	ATATCACCTCCCAACGTTGTACCTTAACCTACCTACCTCCGAGAAACCACCAA	299		
Sbjct 281	ATATCACCTCCCAACGTTGTACCTTAACCTACCTACCTCCGAGAAACCACCAA	332		

**Gambar 5.6 Hasil BLAST gen D-loop nukleotida sampel Nebi (*Query*) terhadap urutan nukleotida dari Database NCBI dengan *sequence* ID: KX882122.1**

Keterangan : 97% : *Query coverage*, 98% : *Ident*

#### 5.4 Analisa Sekuen DNA Gen D-loop

Sekuen gen D-loop dari 2 sampel gajah Sumatera TSI II disejajarkan dengan 4 referensi yaitu gen D-loop *Elephas maximus* Database NCBI Locus AJ224733, D-loop *Elephas maximus* Database NCBI Locus KX882122, D-loop *Loxodonta africana* Database NCBI Locus NC\_000934 dan D-loop *Loxodonta cyclotis* Database NCBI Locus JQ438514, urutan sekuen sampel yang dapat disejajarkan dimulai dari basa ke 76 sampai 357 dengan total target gen yaitu 281 bp (**Gambar 5.7**). Sampel gajah Sumatera Subaru dan Nebi memiliki urutan basa nukleotida yang identik 100%. Kedua sampel tersebut memiliki 4 perbedaan basa nukleotida terhadap referensi gen D-loop *Elephas maximus*. Referensi gen D-loop *Loxodonta cyclotis* memiliki 12 basa nukleotida yang berbeda dengan referensi D-loop *Elephas maximus*, sedangkan *Loxodonta africana* memiliki 14 basa nukleotida yang berbeda dengan referensi D-loop *Elephas maximus*. Hal tersebut menunjukkan bahwa *Loxodonta africana* dan *Loxodonta cyclotis* merupakan

spesies yang berbeda dengan *Elephas maximus*, namun *Loxodonta cyclotis* sendiri memiliki perbedaan 10 basa nukleotida terhadap *Loxodonta africana*. Hubungan kekerabatan dari referensi tersebut dapat diketahui melalui pembuatan pohon filogenetik dari sekuen gen D-loop.

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
            10         20         30         40         50
AJ224733.1 CAAACGAATC AGTTTGCTAT GTACATCGTG CATTACATGC TCGTCCCCAT
Subaru     -----
Nebi      -----
KX882122.1 -----TCGTG CATTAAATGC TCGTCCCCAT
NC000934.1 CAGGCAATC- AACCCGCTAT GTATATCGTG CATTAAATGC TTGTCCCCAT
JQ438514.1 CAAGCAAAC T AACCCGCTAT GTACATCGTG CATTAAATGC TTGTCCCCAT

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
            60         70         80         90        100
AJ224733.1 ACATAATGAT ATATAATACT AACTATACTT AATCTTACAT AGACCATACC
Subaru     -----TACTT AATCTTACAT AGACCATACT
Nebi      -----GAGT ATTTA-TACT A-CTATACTT AATCTTACAT AGACCATACT
KX882122.1 ACATAATGAT ATATAATACT AACTATACTT AATCTTACAT AGACCATACT
NC000934.1 ACATAATGAT ATATAATTACT AACTATACTT AATCTTACAT AGACCATACT
JQ438514.1 ACATAATGAT ATATAATTACT AACTATACTT AATCTTACAT AGACCATACC

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
            110        120        130        140        150
AJ224733.1 ATGTATAATC GTGCATCACA TTATTTACCC CATGCTTATA AGCAAGTACT
Subaru     ATGTATAATC GTGCATCACA TTATTTACCC CATGCTTATA AGCAAGCACT
Nebi      ATGTATAATC GTGCATCACA TTATTTACCC CATGCTTATA AGCAAGCACT
KX882122.1 ATGTATAATC GTGCATCACA TTATTTACCC CATGCTTATA AGCAAGTACT
NC000934.1 ATGTATAATC GTGCATCACA TTATTTACCC CATGCTTATA AGCAAGTACT
JQ438514.1 ATGTATAATC GTGCATCACA TTATTTACCC CATGCTTATA AGCAAGTACT

```



	160	170	180	190	200
AJ224733.1	GTTTAGTCAA	TGTGTCAAGT	CATATTAGTG	TAGATTCACA	GGTTATGTTT
Subaru	GTTTAATCAA	TGTGTTAAGT	CATATTCTTG	TAGATTCACA	GGTTATGTTT
Nebi	GTTTAATCAA	TGTGTTAAGT	CATATTCTTG	TAGATTCACA	GGTTATGTTT
KX882122.1	GTTTAATCAA	TGTGTTAAGT	CATATTCTTG	TAGATTCACA	GGTTATGTTT
NC000934.1	GTTTAACTAA	TGTGTCAAGT	CATATTCATG	TAGATTCACA	GGTCATGTTT
JQ438514.1	GTTTAACTAA	TGTGTCAAGT	CATATTCCTG	TAGATTCACA	GATCATGTTT
	210	220	230	240	250
AJ224733.1	TGGTTCATGG	ATATTGTTCA	CCTACGATAA	ACCATAGTCT	TACATAGCAC
Subaru	TAGTTCATGG	ATATTATTTA	CCTACGATAA	ACCATAGTCT	TACATAGCAC
Nebi	TAGTTCATGG	ATATTATTTA	CCTACGATAA	ACCATAGTCT	TACATAGCAC
KX882122.1	TAGTTCATGG	ATATTATTCA	CCTACGATAA	ACCATAGTCT	TACATAGCAC
NC000934.1	TGGTTCATGG	ATATTATTTA	CCTACGATAA	ACCATAGTCT	TACATAGCAC
JQ438514.1	TAGTTCATGG	ATATTATTCA	CCTACGATAA	ACCATAGTCT	TACATAGCAC
	260	270	280	290	300
AJ224733.1	ATTAAAGCTC	TTGATCGTAC	ATAGCGCATT	ACTGAGAAAT	TTCTAGTCAT
Subaru	ATTAAAGCTC	TTGATCGTGC	ATAGCGCATT	ACTGAGAAAT	CTCTAGTCAT
Nebi	ATTAAAGCTC	TTGATCGTGC	ATAGCGCATT	ACTGAGAAAT	CTCTAGTCAT
KX882122.1	ATTAAAGCTC	TTGATCGTGC	ATAGCGCATT	ACTGAGAAAT	CTCTAGTCAT
NC000934.1	ATTAAAGCTC	TTGATCGTAC	ATAGCACATC	ACTGAGAAAT	CTCTAGTCAC
JQ438514.1	ATTAAAGCTC	TTGATCGTAC	ATAGCACATT	ACTGAGAAAT	CTCTAGTCAC
	310	320	330	340	350
AJ224733.1	CATGCATATC	ACCTCCAACG	GTTGTACTTT	AACTACCTAC	CTCCGAGAAA
Subaru	CATGCATATC	ACCTCCAACG	GTTGTACCTT	AACTACCTAC	CTCCGAGAAA
Nebi	CATGCATATC	ACCTCCAACG	GTTGTACCTT	AACTACCTAC	CTCCGAGAAA
KX882122.1	CATGCATATC	ACCTCCAACG	GTTGTACCTT	AACTACCTAC	CTCCGAGAAA
NC000934.1	CATGCATATC	ACCTCCAATG	GTTGTACCTT	AACTACCTAC	CTCCGAGAAA
JQ438514.1	CATGCATATC	ACCTCCAACA	GTTGTACCTT	AACTACCTAC	CTCCGAGAAA
	360	370	380	390	400
AJ224733.1	CCACCAACCC	GCCCATCTTC	GTGTCCCTCT	TCTCGCTCCG	GGCCCATCAA
Subaru	CCACCAAAA-	-----	-----	-----	-----
Nebi	CCACCAA--	-----	-----	-----	-----
KX882122.1	CCATCAACCC	GCCCATCTTC	GTGTCCCTCT	TCTCGCTCCG	GGCCCATCAA
NC000934.1	CCATCAACCC	GCCCATCTTC	GTGTCCCTCT	TCTCGCTCCG	GGCCCATCAA
JQ438514.1	CCATCAACCC	GCCCATCTTC	GTGTCCCTCT	TCTCGCTCCG	GGCCCATCAA

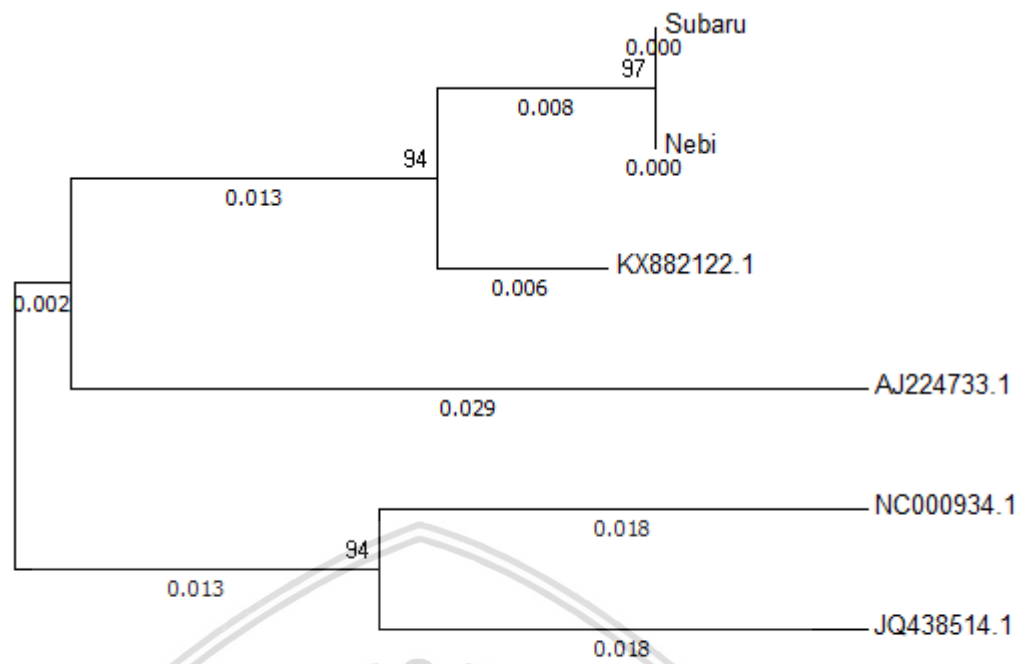
**Gambar 5.7** Penayajaran sekuen gen D-loop sampel Subaru dan Nebi terhadap 4 referensi gen D-loop

Berdasarkan **Gambar 5.7** dapat dilihat adanya perubahan basa nukleotida pada sampel terhadap referensi Database NCBI Locus KX882122.1. Pergantian basa yang terjadi pada kedua sampel hanya terlihat jenis transisi. Menurut Aisah

dkk (2015), ketika pirimidin diganti oleh pirimidin yang lain atau purin oleh purin yang lain, mutasi tersebut disebut dengan transisi. Ketika pirimidin diganti oleh purin, atau sebaliknya, mutasi disebut dengan tranversi. Kedua sampel yaitu gajah Sumatera Subaru dan Nebi menunjukkan pergantian basa jenis transisi pada basa nukleotida ke-147 (T→C), ke-204 (C→T), ke-219 (C→T) dan ke-354 (T→C).

### 5.5 Hubungan Kekerbatan Gajah Sumatera Berdasarkan Pohon Filogenetik

Analisa filogenetik berkaitan erat dengan peristiwa evolusi biologis, evolusi adalah proses gradual suatu organisme yang memungkinkan spesies sederhana menjadi lebih kompleks. Keturunan suatu organisme akan memiliki perbedaan dengan nenek moyangnya sebab sedang berubah dalam proses evolusi. Selain mempelajari tentang evolusi, analisa filogenetik dapat digunakan untuk mempelajari variasi dan diferensiasi genetik antar populasi dengan menghitung jarak genetik dari jumlah perbedaan basa polimorfik suatu lokus gen berdasarkan urutan DNA. Analisis filogenetik biasanya direpresentasikan sebagai sistem percabangan seperti diagram pohon yang dikenal sebagai pohon filogenetika (Brinkman and Leipe, 2001). Pohon filogenetik dapat dibuat menggunakan software Mega 7. Metode yang digunakan untuk mendesain pohon filogenetik adalah Neighbor-Joining dengan replikasi bootstrap 1000x yang hasilnya ditunjukkan pada **Gambar 5.8**. Perhitungan jarak genetik menggunakan metode *pairwise distance* yang hasilnya ditunjukkan pada **Tabel 5.5**.



**Gambar 5.9 Pohon filogenetik** Gajah Sumatera menggunakan metode *Neighbor-Joining* dengan replikasi *bootstrap* 1000x.

Keterangan : AJ224733.1 : *Elephas maximus* Locus AJ224733.1, KX882122.1 : *Elephas maximus* Locus KX882122.1, NC\_000934.1 : *Loxodonta africana* Locus NC\_000934.1 dan JQ438514.1 : *Loxodonta cyclotis* Locus JQ438514.1

Neighbor joining merupakan metode yang paling umum digunakan untuk mengkonstruksi pohon filogenetik berbasis metode jarak (*distance method*). Kombinasi neighbor joining dengan analisis bootstrap dapat menjadi pilihan untuk mengevaluasi pohon filogenetik berbasis jarak. Neighbor joining memilih sekuen yang jika digabungkan akan memberi estimasi terbaik dari panjang cabang yang paling dekat merefleksikan jarak yang nyata diantara sekuen (Dharmayanti, 2011).

Bootstrap adalah prosedur statistika yang melakukan sampling dari sebuah populasi yang dikerjakan dengan cara resampling dari sampel. Dalam analisa filogenetik, metode bootstrap diaplikasikan dengan *resample* data, dengan secara acak memilih kolom vertikal dari sekuen yang dijejerkan untuk menghasilkan penjejeran dan dalam pengaruh sebuah penjejeran baru dengan panjang yang sama. Masing masing kolom digunakan lebih dari satu kali dan beberapa kolom mungkin tidak digunakan pada semua penjejeran yang baru. Sebagai contoh validitas penyusunan cabang dalam prediksi pohon filogenetik dapat diuji dengan *resampled* dari kolom dalam *multiple sequence alignment* untuk membentuk beberapa penjejeran baru (Dharmayanti, 2011).

Berdasarkan pohon filogenetik pada **Gambar 5.8**, diketahui bahwa sampel gajah Sumatera Subaru dan Nebi berada dalam clade yang sama dengan jarak genetik 0,000 yang menunjukkan bahwa kedua sampel tersebut berkerabat dekat yang memiliki *common ancestor* yang sama. Kedua sampel memiliki jarak genetik sebesar 0.014 terhadap referensi Gajah Asia dengan *sequence ID* KX882122.1 yang didapatkan dari hasil BLAST NCBI sedangkan jarak genetik terhadap sekuens d-loop Gajah Asia dengan *sequence ID* AJ224733.1 yang digunakan sebagai referensi desain primer lebih besar yaitu 0.050. Pohon filogenetik pada **Gambar 5.8** menunjukkan adanya 2 clade besar, yaitu clade Gajah Asia yang didalamnya terdapat sampel Gajah Sumatera, dan clade Gajah Afrika yang didalamnya terdapat 2 spesies yaitu Gajah Sabana Afrika (*Loxodonta africana*) Locus NC000934.1 dan Gajah Hutan Afrika (*Loxodonta cyclotis*) Locus JQ438514.1, hal tersebut menunjukkan bahwa Gajah Sabana Afrika dan Gajah Hutan Afrika merupakan spesies yang berbeda dengan Gajah Asia. Pohon



filogenetik tersebut dibuat berdasarkan jarak genetik dari perhitungan pairwise distance yang ditunjukkan pada **Tabel 5.5**.

**Tabel 5.5** Data Perhitungan *Pairwise Distance*

	AJ224733	Subaru	Nebi	KX882122.1	NC000934.1	JQ438514.1
	1	2	3	4	5	6
1. AJ224733.1						
2. Subaru	0.050					
3. Nebi	0.050	0.000				
4. KX882122.1	0.050	0.014	0.014			
5. NC000934.1	0.064	0.053	0.053	0.053		
6. JQ438514.1	0.060	0.057	0.057	0.050	0.035	

Hasil perhitungan pada **Tabel 5.5** menunjukkan bahwa gajah Sumatera Subaru dan Nebi memiliki perbedaan sebesar 0% yang menunjukkan bahwa kedua individu gajah Sumatera tersebut masih memiliki hubungan saudara yang kemungkinan besar berasal dari satu indukan. Sampel gajah Sumatera memiliki perbedaan dengan referensi Gajah Asia yang berasal dari Myanmar sebesar 1,4%, dan memiliki perbedaan lebih dari 5% terhadap referensi Gajah Afrika.

Sampel gajah Sumatera Subaru dan Nebi tidak dapat dikawinkan karena mereka memiliki kemiripan sebesar 100%, jika kedua individu tersebut dikawinkan maka dapat terjadi *inbreeding* yang dapat memunculkan efek negatif dari perkawinan *inbreeding* dan menurunkan kemurnian genetik keturunan hasil perkawinan kedua individu tersebut.

## BAB 6 PENUTUP

### 6.1 Kesimpulan

Gajah Sumatera dengan identitas Subaru dan Nebi memiliki jarak genetik 0% yang menunjukkan bahwa kedua individu berkerabat sangat dekat dengan kemiripan sekuen gen D-loop sebesar 100%. Jarak genetik antara kedua Gajah Sumatera TSI II dan referensi gajah Asia sebesar 1,4 %, sedangkan jarak genetik antara Gajah Sumatera dan referensi gajah Afrika lebih dari 5%. Gajah Sumatera Subaru dan Nebi yang berada di Taman Safari Indonesia II Prigen sebaiknya tidak dikawinkan untuk mencegah efek negatif dari perkawinan *inbreeding* sehingga keragaman genetik gajah Sumatera tetap terjaga.

### 6.2 Saran

Dalam upaya menjaga keragaman genetik, diperlukan penelitian kekerabatan lanjutan untuk gajah Sumatera yang berada di lembaga konservasi eksitu maupun insitu yang menjalankan program *breeding* seperti Taman Safari Indonesia II agar tidak terjadi perkawinan *inbreeding*, terutama untuk gajah Sumatera yang belum memiliki silsilah keturunan yang jelas.

## DAFTAR PUSTAKA

- Aisah Isah., Edi Kurniadi., Ema Carnia dan Nurul Ula. 2015. *Representasi Mutasi Kode Genetik Dasar Berdasarkan Basa Nukleotida*. Jurnal Matematika Integratif, Volume 11 No.1, April 2015.
- Altevogt, R., dan Kurt. 1997. *Elephant in Sumatera Island In Managing*. Elephant Depredation in Agriculture and Forestry Project. Washington DC, Word Bank.
- Arif, I. A. & Khan, H. A., 2009. *Molecular markers for biodiversity analysis of wildlife animals: a brief review*. Animal Biodiversity and Conservation, 32.1
- Bioninja. 2016. *DNA Sequencing*. <http://ib.bioninja.com.au/higher-level/topic-7-nucleic-acids/71-dna-structure-and-replic/dna-sequencing.html>. [19 Agustus 2017].
- Bulla A, De Witt B, Ammerlaan W, Betsou F and Lescuyer P. 2016. Blood DNA Yield but Not Integrity or Methylation Is Impacted After Long-Term Storage. *Biopreservation and Biobanking* 14(1).
- Brinkman, F. And D. Leipe. 2001. *Phylogenetic Analysis*. In : *Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Gene and Protein*. Baxevanis, A.D. and B.F.F. Ouellette (Eds). John Willey & Sons.
- Choudhury, A., Lahiri Choudhury, D.K., Desai, A., Duckworth, J.W., Easa, P.S., Johnsingh, A.J.T., Fernando, P., Hedges, S., Gunawardena, M., Kurt, F., Karanth, U., Lister, A., Menon, V., Riddle, H., Rübel, A. & Wikramanayake, E. (IUCN SSC Asian Elephant Specialist Group). 2008. *Elephas maximus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2008: e.T7140A12828813.
- Dharmayanti, N. 2011. *Filogenetika Molekuler: Metode Taksonomi Organisme Berdasarkan Sejarah Evolusi*. WARTAZOA 21 (1): 1-10.
- Faizah, Ulfi. 2009. *Karakteristik Marka Genetik Daerah D-Loop Bagian Hvs-I Sebagai Acuan Konservasi Genetik Harimau Sumatera*. Prosiding Seminar Nasional Penelitian, Pendidikan dan Penerapan MIPA. Yogyakarta.
- Fatchiyah. 2008. *Buku Praktis: Mengenal Polymerase Chain Reaction Dasar Teknik Amplifikasi DNA & Aplikasinya*. UB. Malang
- Fatchiyah, E. L. Arumingtyas, S. Widyarti, dan S. Rahayu. 2009. *Dasar-Dasar Analisa Biologi Molekuler*. LSIH Press. Malang
- Fatchiyah, E. L. Arumningtyas, S. Widyarti, dan S. Rahayu. 2011. *Biologi Molekuler. Prinsip Dasar Analisis*. Jakarta. Penerbit Erlangga.
- Fowler, M.E., S.K Mikota (Editor). 2006. *Biology, Medicine, and Surgery of Elephants*. Blackwell Publishing, Oxford, United Kingdom.

- Gopala, A., Hadian, O., Sunarto, ., Sitompul, A., Williams, A., Leimgruber, P., Chambliss, S.E. & Gunaryadi, D. 2011. *Elephas maximus ssp. sumatranus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2011: e.T199856A9129626.
- Greenberg, B.D., Newbold, J.E., Sugino, A., .1983. *Intraspecific nucleotide sequence variability surrounding the origin of replication in human mitochondrial DN*. Gene.
- Handoyo, D dan Ari Rudiretna. 2000. *Prinsip Umum dan Pelaksanaan Polymerase Chain Reaction (PCR)*. Unitas, Vol.9, No 1.
- Hauf,J., Waddell,P.J., Chalwatzis,N., Joger,U. and Zimmermann,F.K. 2000. *The Complete Mitochondrial Genome Sequence Of The African Elephant (Loxodonta Africana), Phylogenetic Relationships Of Proboscidea To Other Mammals And D-Loop Heteroplasmy*. Zoology 2000;102.
- Horai S., R. Kondo, Y. Nakagawa-Hattori, S. Hayashi, S. Sonada and K. Tajimaas. 1993. *Peopling of the Americas, founded by four major lineages of mitochondrial DNA*. Mol Biol Evol. 10.
- Jazin E, Himla Soodyall, Paula Jalonen, Eva Lindjelm, Mark Stoneking and Ulf Gyllensten. 1998. *Mitochondrial Mutation Rate Revisited : Hot Spots and Polymorphism*. Nature Genetic, 18.
- Jurnal bumi. 2010. Gajah Sumatera. <https://jurnalbumi.com/gajah-sumatera/#ciri-ciri-gajah-sumatera> [10 Juli 2015)]
- Nanodrop Technologies, Inc. 2009. *ND-1000 Spectrophotometer V3.5 User's Manual*. Wilmington (US): Nanodrop Technologies, Inc
- Nanodrop Technologies, Inc. 2007. *260/280 and 260/230 Ratios Nanodrop ND-1000 and ND-8000 8-Sample Spectrophotometers*. Wilmington (US): Nanodrop Technologies, Inc
- Obenrader, Sarah. 2003. *The Sanger Method*. Davidson College. North Carolina.
- Olsvik, O., J. Whalberg, B. Petterson, M. Uhlen, T. Popovic, I.K. Wachmuth, and P.I. Fields. 1993. *Use of automated sequencing of polymerase chain reaction-generated amplicons to indentify three types of cholera toxin subunit B in Vibrio cholerae O1 strains*. Journal of Clinical Microbiology 31.
- Ratnayani K., Sagung C.Y., Liangky S.S. 2009. *Amplifikasi Fragmen 0,4 KB Daerah D-LOOP DNA Mitokondria Lima Individu Suku Bali Tanpa Hubungan Kekerabatan Dengan Metode Polymerase Chain Reaction (PCR)*. Jurusan Kimia FMIPA Universitas Udayana, Bukit Jimbaran.
- Sasmito, Dinda Eling K., Rahadian Kurniawan dan Izzati Muhimmah. 2014. *Karakteristik Primer pada Polymerase Chain Reaction (PCR) untuk Sekuensing DNA : Mini Review*. Seminar Nasional Informatika Medis (SNIMed) V 2014.

- Somma, M and M. Querci. 2006. *The Analysis of Food Samples for the Presence of Genetically Modified Organisms*. World Health Organization Regional Office For Europe.
- Sulistyaningsih, E. 2007. *Polymerase Chain Reaction (PCR): Era Baru Diagnosis dan Manajemen Penyakit Infeksi*. J. Biomedis, Vol 1
- Susanto, Agus Hery. 2012. *Bahan Ajar Biologi Molekuler*. Fakultas Biologi Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto
- Susmiarsih, T. 2010. *Peran Genetik DNA Mitokondria (mtDNA) Pada Motilitas Spermatozoa*. Majalah Kesehatan PharmaMedika, 2010 Vol.2, No.2.
- Wandia, I Nengah. 2001. *Genom Mitokondria*. Jvet Vol 2 (4) 2001.
- WWF. 2017. <https://www.worldwildlife.org/species/sumatran-elephant>. Diakses 12 Juli 2017.

